

Rafael Eduardo Oliveira Rocha

ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR DOS MECANISMOS DE  
AFINIDADE RELATIVA PARA QUATRO GALANTAMÍNICOS COM  
POTENCIAL ANTI-ALZHEIMER

Belo Horizonte, MG

Julho de 2017

Rafael Eduardo Oliveira Rocha

**ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR DOS MECANISMOS DE  
AFINIDADE RELATIVA PARA QUATRO GALANTAMÍNICOS COM  
POTENCIAL ANTI-ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioinformática.

Orientador: Leonardo Henrique França de Lima

**Belo Horizonte, MG**

**Julho de 2017**

"[...]

*Circe aparece, e abrindo as portas  
Resplendentes, convida esses incautos;  
Só, receoso, Euríloco repugna.  
Senta-os a deusa em tronos e camilhas;  
Escândea e queijo com Paneio vinho  
Mistura e fresco mel, poção lhe ajunta  
Que deslembra da pátria. Mal a engolem,  
Toca-os de vara, na pocilga os fecha,  
Porcos sendo no som, no vulto e cerdas,  
A inteligência embora conservassem.  
[...]*

*Veio Euríloco à pressa anunciar-nos  
O caso infando, que articula apenas  
Pela força da dor, pois lhe excitava  
Luto no coração, água nos olhos;  
E, instado, o exício narra: 'Ao teu preceito,  
Fomos, Laércio, num convale achamos  
Em vistoso lugar marmóreo paço.  
Mulher ou deusa que a tecer cantava,  
Abre, ao nosso gritar, fulgentes portas:  
Este convite, eu só de fora, temo;  
De esperar canso, os mais desapareceram.'*

*De tachonado bronze a tiracolo  
E o arco aos ombros, pela mesma senda  
Mando que me encaminhe; ele os joelhos  
Chorando me abraçou: 'Divino aluno,  
A ir não me constranjas. Tu não voltas,  
Sei que os nossos perderam-se; os restantes  
Esquivemos, fugindo, o negro fado.'  
'Bebe e come, retruco, em ócio a bordo;  
Por mim clama o dever.' E a trilha enceto.*

*Já, pelo sacro bosque, avisto o alcáçar  
Da venéfica Circe, quando o nume  
Do caduceu me encontra, afigurado  
Num gentil gracioso adolescente;  
Ele trava-me a destra: 'Ignotos serros,  
Mísero, andas sozinho? os teus, quais porcos,  
Os tem Circe em fortíssimo escondrijo.  
Vens tu livrá-los? sorte igual te espera.  
Antídoto haverás, que te preserve  
Da encantadora.'  
[...]*

*Da terra aqui Mercúrio extraiu planta,  
E ma explicou: raiz escura tinha  
E láctea a flor; os deuses moli a chamam;  
É-lhes fácil cavá-la, aos homens custa.  
Foi-se da ilha espessa ao grande Olimpo;  
Nisto e pensoso dirigi-me a Circe.  
[...]*

*Repliquei-lhe: 'A contigo humanizar-me*

*Tu, Circe, me alicias, tu que em porcos  
Meus sócios transformaste, e aqui dolosa  
Me instigas ao teu leito, a fim que, inermes  
E despido me enerves e efemines?  
Solene jura, ó deusa, que em meu dano  
Mais nada empreenderás.'  
[...]*

*Ela, pegando a vara, sai de casa  
E abre o chiqueiro; tira-os parecidos  
A varrões de nove anos, em fileira  
Um por um vai com bálsamo esfregando,  
Cair fazendo o pelo que o veneno  
Exicial criara, e mais os torna  
Jovens e esbeltos. A chorar de gosto,  
Beijam-me a destra, o pranto ressoava.  
Doeu-se a deia: 'Ulisses engenhoso  
Em seco o vaso, nas vizinhas grutas  
Guarda o que tens, riquezas e aparelhos;  
Venham contigo os prediletos sócios.'"*

**Trechos de "Odisseia" de Homero, descrevendo a jornada de Ulisses para salvar seus companheiros de viagem padecidos sobre os feitiços de Circe, perdendo suas memórias e personalidades originais. Para libertá-los do encantamento, o herói utiliza-se do presente de Mercúrio (moli, uma flor de aparência láctea) no preparo do antídoto capaz de retorná-los à sanidade.**

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha mãe, Edna Maria de Oliveira, pelo porto-seguro que representa e por toda a educação, carinho, amor e dedicação que pude usufruir desde que me lembro. Aos meus irmãos, Guilherme Oliveira Xavier e Thais Oliveira, por tornarem minha vida mais significativa.

À toda equipe do Laboratório de Modelagem Molecular e Bioinformática da UFSJ pelo crescimento científico que me foi concedido, especialmente a meu orientador Prof. Dr. Leonardo Henrique França de Lima, mestre, conselheiro e modelo intelectual/profissional/ético que busco alcançar.

Ao Laboratório de Bioinformática e Sistemas da UFMG pelo uso de suas instalações e a toda a equipe do laboratório pelo convívio tranquilo, pacífico e cientificamente inspirador.

À Universidade Federal de Minas Gerais e seus professores.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique da Silveira e Profa. Dra. Rafaela Ferreira Salgado pelos preciosos conselhos.

Ao grupo de RPG que participo pela épica campanha em que incorporei Morpheus, o druida vegetariano.

Ao Facebook e Google por suas ferramentas de comunicação que me permitiram uma orientação sem qualquer penalidade oriunda da distância entre o LMMB e o LBS.

Às bandas Gloryhammer, Avantasia, Halloween, Orden Ogan, Tuatha de Danann entre outras por embalarem as numerosas madrugadas de trabalho.

A todos os que, de alguma maneira, contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal durante o mestrado.

## Resumo

A doença de Alzheimer é atualmente um sério problema de saúde pública e econômico oriundo do aumento da expectativa de vida da população mundial, que resulta em complicados sintomas psicológicos em portadores dessa doença e reflete em devastadores efeitos sociais aos seus amigos e familiares. Tais características resultam no redirecionamento de parte das atenções da comunidade científica para o planejamento de estratégias que buscam diminuir ou cessar tais efeitos. Uma dessas estratégias incide sobre o sistema colinérgico de neurotransmissão, buscando inibir a acetilcolinesterase e conseqüentemente, aumentar a concentração de acetilcolina no espaço sináptico. Isso permite que o sinal neural seja prolongado em casos de danos aos neurônios em doenças neurodegenerativas. Um inibidor natural dessa enzima, a galantamina, mostra-se especialmente promissor. Dois derivados de galantamina, a sanguinina e a licoramina, diferem quimicamente dessa, respectivamente, apenas por uma substituição metoxi-hidroxi e uma mudança de ligação  $sp^2$ - $sp^3$ . Esses compostos mostram, no entanto, modificações totalmente diferentes e opostas na atividade inibitória original. A simples análise estrutural de estruturas rígidas não revela os mecanismos pelos quais tais sutis distinções químicas resultam em diferenças de afinidade tão drásticas. Aqui, usamos métodos de modelagem computacional e dinâmica molecular para melhor acessar os fatores moleculares de tais distinções. Para verificação dos efeitos cumulativos associados a tais substituições, um ligante híbrido de licoramina e sanguinina foi também modelado. Os resultados sugerem que as diferenças na mobilidade do anel não-aromático presente em licoramina (com a modificação  $sp^2$ - $sp^3$ ), implicam em uma maior facilidade de hidratação desse ligante em solução, além de drásticas penalidades conformacionais, vibratórias e entrópicas na ligação em comparação com galantamina. Por sua vez, a possibilidade do estabelecimento de uma rede de ligações de hidrogênio adiciona vantagens entálpicas para a ligação de sanguinina. Efeitos cumulativos das modificações estudadas são observados com as análises do ligante híbrido. Esses resultados, ao mesmo tempo que sugerem uma classificação de afinidade em consonância com a literatura, também sugerem ideias que esperamos serem úteis no planejamento mais racional de medicamentos anti-Alzheimer.

## Abstract

Alzheimer's disease is currently a serious public health and economic problem stemming from the increased life expectancy of the world's population, which results in complicated psychological symptoms in people with this disease and reflects on devastating social effects on their friends and family. These characteristics result in the redirection of part of the attention of the scientific community to the planning of strategies that seek to decrease or to cease these effects. One of these strategies focuses on the cholinergic system of neurotransmission, searching to inhibit acetylcholinesterase and consequently increase the concentration of acetylcholine in the synaptic space. This allows the neural signal to be prolonged in cases of damage to neurons in neurodegenerative diseases. A natural inhibitor of this enzyme, galantamine, is especially promising. Two galantaminic derivatives, sanguinine and lycoramine, chemically differ from this, respectively, only by a methoxy-hydroxy substitution and a  $sp^2$ - $sp^3$  binding change. These compounds, however, show very different and opposite modifications in the original inhibitory activity. The simple structural analysis of rigid structures does not reveal the mechanisms by which such subtle chemical distinctions result in such drastic affinity differences. Here, we use computational modeling and molecular dynamics methods to better access the molecular factors of such distinctions. To verify the cumulative effects associated with such substitutions, a hybrid ligand of lycoramine and sanguinine was also modeled. The results suggest that the differences in the mobility of the non-aromatic ring present in lycoramine (with the  $sp^2$ - $sp^3$  modification) imply a greater ease of hydration of this ligand in solution, in addition to drastic conformational, vibratory and entropic penalties in the binding compared to galantamine. In turn, the possibility of establishing a hydrogen-bonds network adds enthalpic advantages for sanguinine binding. Cumulative effects of the studied modifications are observed with hybrid ligand analyzes. These results, while suggesting an affinity ranking in line with the literature, also suggest ideas that we hope will be useful in more rational planning of anti-Alzheimer's drugs.

## Lista de Abreviaturas

- Ach** Acetilcolina (do inglês *Acetylcholine* )
- AchE** Acetilcolinesterase (do inglês *Acetylcholinesterase* )
- C** Carbono
- DA** Doença de Alzheimer
- DPOC** Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- FF** Campos de Força (do inglês *Force Field* )
- GAFF** *General Amber Force Field*
- Gal** Galantamina
- H** Hidrogênio
- hAChE** Acetilcolinesterase Humana (do inglês *human Acetylcholinesterase* )
- HB** Ligação de Hidrogênio (do inglês *Hydrogen Bond* )
- HM** Coincidência Hidrofóbica (do inglês *Hydrophobic Matching* )
- HR** Restrição Harmônica (do inglês *harmonic restraint* )
- ILS** Busca Local Iterada (do inglês *Iterated Local Search* )
- LJ** Lennard-Jones
- MD** Dinâmica Molecular (do inglês *Molecular Dynamics* )
- N.E.** Não Encontrado
- NPT** número de partículas, temperatura e pressão constantes
- O** Oxigênio
- PAS** Sítio Aniônico Periférico (do inglês *Peripheral Anionic Site* )
- PDB** *Protein Data Bank*
- RMSD** Desvio Quadrático Médio (do inglês *Root-Mean-Square Deviation* )
- SAS** Superfície Acessível ao Solvente
- Sng** Sanguinina
- UFF** *Universal Force Field*
- vdW** van der Waals

## Lista de Figuras

- Figura 1. Estrutura molecular da Ach, molécula chave para a via colinérgica de neurotransmissão. Imagem estrutural obtida segundo metodologia apresentada. .... 15
- Figura 2. Estrutura tridimensional de hAChE (código PDB 4EY6) em diversas disposições espaciais, colorida em gradiente por proximidade às extremidades em termos de estrutura primária (azul = amino-terminal, vermelho = carboxi-terminal). As dimensões aproximadas da proteína são apresentadas para todos os eixos por barras pretas. A altura aproximada da cavidade ativa é apresentada por barra amarela. Eventuais rotações na proteína são indicadas por barras vermelhas e a direção dessa rotação é indicada por setas circulares pretas. A linha tracejada preta indica corte transversal na estrutura proteica para melhor visualização do sítio-ativo. As imagens estruturais foram obtidas segundo metodologia apresentada. 17
- Figura 3. Detalhamento tridimensional da cavidade ativa de hAChE (código PDB 4EY6) com posicionamento experimental da Gal (azul ciano) e resíduos importantes para o reconhecimento desse inibidor, todos representados como *sticks*. A superfície interna da cavidade é apresentada em laranja usando visualização do tipo *surface*. As imagens estruturais foram obtidas segundo metodologia apresentada. .... 18
- Figura 4. Estruturas moleculares dos principais inibidores naturais de hAChE utilizados para o tratamento paliativo da DA. Note a presença de anéis aromáticos em todos eles. Imagens estruturais obtidas segundo metodologia apresentada. .... 19
- Figura 5. Padrão de contatos para a Gal (roxo) experimental obtida do complexo cristalográfico hAChE-Gal (código PDB 4EY6). Notar interações de empilhamento com resíduo W68. Imagem obtida segundo metodologia apresentada. .... 20
- Figura 6. Fórmula estrutural de A) Gal; B) Sng; C) Lyc; D) Hyb, destacando as diferenças químicas em cada ligante em relação a Gal. O  $IC_{50}$  relativo ( $IC_R^{50}$ ) é obtido dividindo-se o valor de  $IC_{50}$  encontrado na literatura para os ligantes derivados pelo valor de  $IC_{50}$  da Gal. Os dados de  $IC_R^{50}$  para Hyb não foram encontrados (N.E.) na literatura. Os carbonos envolvidos na modificação C5-C6<sup>sp2-sp3</sup> são destacados em todos os ligantes. Imagens estruturais obtidas segundo metodologia apresentada. .... 22
- Figura 7. Esquema simplificado do algoritmo ILS para otimização de poses. O mesmo utiliza combinação de buscas locais (setas azuis) e perturbações (seta vermelha) para varrer o espaço conformacional de um ligante no sítio-ativo de uma proteína (ver texto para mais detalhes). .... 25
- Figura 8. Esquema ilustrando o comportamento do potencial de ligação do FF clássico para um par de átomos qualquer em comparação com o potencial de Morse (linha tracejada azul). Modificações na constante de ligação  $k_i^{lig}$  são mostradas para mais (linha preta) e para menos (linha cinza) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar um aumento e diminuição na restrição de estiramento entre dois átomos dependendo do contexto da ligação entre eles (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial de ligação nulo. .... 32
- Figura 9. Esquema ilustrando o comportamento do potencial angular do FF clássico (linha vermelha) para um trio de átomos quaisquer ligados covalentemente com a



formação do ângulo  $\theta$  (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial angular nulo. .... 33

Figura 10. Esquema ilustrando o comportamento do potencial de diedro próprio do FF clássico para um par de átomos qualquer separados por três ligações covalentes. Uma modificação na constante diedral  $k_i^{\text{died}}$  é mostrada (linha preta) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar um aumento/diminuição na restrição de rotação do diedro dependendo do contexto da ligação (ver texto para mais detalhes). Uma modificação na constante  $n_i$  é mostrada (linha cinza) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar um aumento/diminuição na frequência do potencial dependendo do número de átomos envolvidos no diedro (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial de diedro próprio nulo. O plano arroxeadado e alaranjado presente na estrutura atômica à direita representa o plano de rotação sobre os quais o ângulo torcional  $\varphi$  é calculado..... 34

Figura 11. Esquema ilustrando o comportamento do potencial de diedro impróprio do FF clássico (linha vermelha) para quatro átomos quaisquer ligados covalentemente com a formação de um plano (plano arroxeadado na estrutura molecular à direita) sobre o qual é calculado o ângulo  $\psi$  (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial de diedro impróprio nulo..... 35

Figura 12. Esquema ilustrando o comportamento do potencial de LJ do FF clássico para um par de átomos qualquer não-ligados. Uma modificação na constante  $\sigma_{ij}$  é mostrada (linha preta) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar um deslocamento no potencial de forma a melhor descrever a variedade de possibilidades de pares atômicos possíveis. Uma modificação na constante  $\epsilon_{ij}$  é mostrada (linha cinza) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar um aumento/diminuição no poço de potencial dependendo da eletronegatividade dos átomos envolvidos na interação (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial de LJ nulo. A linha tracejada amarela entre os átomos a direita indica a distância  $r$  entre eles, sobre a qual o potencial de LJ é calculado..... 36

Figura 13. Esquema ilustrando o comportamento do potencial de Coulomb do FF clássico para um par de átomos qualquer não-ligados. Uma modificação na constante no produto das cargas dos dois átomos é mostrada (linha preta) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar uma mudança na natureza repulsiva ou atrativa da interação dependente dos sinais das cargas desses dois átomos. Uma modificação na constante  $\epsilon_0$  é mostrada (linha cinza) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar uma distorção no potencial dependendo da permissividade elétrica do meio (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial de Coulomb nulo. A linha tracejada amarela entre os átomos a direita indica a distância  $r$  entre eles, sobre a qual o potencial de Coulomb é calculado. .... 37

Figura 14. Esquematização do processo de obtenção da variação de entropia estimada pelo método de colônia adaptada por Martínez e Nascimento, 2009 para um sistema modelo; A) subdivisão do universo amostral em 4 células, universo esse obtido através de análises de energias totais e respectivos RMSDs ao longo da

trajetória de MD. Note que todas as células estão ocupadas, totalizando um  $\omega = 4$ ; B) subdivisão do universo amostral em 9 células, onde nem todas as células estão ocupadas por ao menos um ponto, totalizando um  $\omega = 7$ ; C) exemplo de gráfico obtido após a subdivisão infinitesimal do universo amostral e suas respectivas ocupâncias  $\omega$ ; D) exemplo de gráfico obtido após a divisão das ocupâncias  $\omega$  para dois estados de um mesmo sistema (por exemplo, o estado livre e o estado complexado de um ligante); E) exemplo de gráfico obtido pela aplicação da fórmula clássica de variação de entropia para cada  $\omega_2/\omega_1$  obtido no gráfico anterior. Note o surgimento de um poço que sinaliza o valor mais provável da variação de entropia (linha tracejada; ver texto para mais detalhes). ..... 44

Figura 15. Análise estrutural comparando as duas conformações AP inicial de hAChE usadas neste estudo. Os respectivos valores de desvio quadrático médio baixo (RMSD) mostram nenhuma distinção substancial considerando tanto o backbone da proteína principal (esquerda) como as topologias de átomos pesados do site ativo (direita). Os aminoácidos que mostram interações significativas para todos os ligantes e mais discutidos ao longo do texto têm suas respectivas superfícies de Van der Waals descritas em transparentes. .... 45

Figura 16. Posições mais favoráveis retornadas por análises de atracamento para cada ligante em 4EY6 (A) e 3LII (B) mostram reprodutibilidade quando comparadas ao posicionamento cristalográfico de Gal e os mesmos resíduos que os mediadores da afinidade para todos os ligantes aqui estudados. Em cada imagem, a flecha preta aponta para a "ponta" que surge com a angularidade tetraédrica da ligação C5-C6 com a substituição C5-C6<sup>sp2-sp3</sup> e que se projeta na direção da cadeia lateral W86 (mostrada em bastões e em esferas van der Waals transparentes), enquanto a flecha marrom aponta para a localização da modificação metoxi-hidroxi. Os resíduos S203 (bastões) e F297 (bastões e esferas de van der Waals), que interagem com estes ligantes também são destacados. A análise dos escores de atracamento para as cinco melhores poses de cada replicata para cada ligante (C) separa estatisticamente os ligantes C5-C6<sup>sp2</sup> (Gal e Sng) dos ligantes C5-C6<sup>sp3</sup> (Lyc e Hyb). As letras acima das linhas de desvio mostram grupos com base no teste ANOVA (veja o texto para detalhes e discussões). ..... 53

Figura 17. RMSD ao longo da trajetória de cada simulação de MD relacionada ao seu respectivo *frame* inicial. As trajetórias dos quatro galantamínicos diferentes (Gal, Sng, Lyc e Hyb) vinculadas a cada uma das estruturas de hAChE amostradas ("4EY6" e "3LII") ou em cada uma das repetições das simulações MD para o ligante livre ("Livre1" e "Livre 2") são devidamente identificados. Para as simulações ligadas à proteína, o RMSD é varrido ao longo da trajetória considerando o *backbone* da proteína, enquanto que para as trajetórias "livres" são considerados os átomos pesados do ligante. .... 54

Figura 18. Distribuição de clusters ao longo das trajetórias de MD para as simulações livres (esquerda) e ligadas (direita) para Gal (pontos azuis), Sng (pontos vermelhos), Lyc (pontos cinzas) e Hyb (pontos amarelos). Linhas tracejadas pretas indicam o limiar de mudança da simulação 1 para a simulação 2 (para as trajetórias livres) e o limiar de mudança da simulação em 3LII para a simulação em 4EY6 (para as trajetórias ligadas), sugerindo não histerese em qualquer uma das simulações (veja o texto para detalhes e discussões). ..... 55

- Figura 19. Superposição dos *frames* pertencentes aos agrupamentos conformacionais significativamente representativos (1% ou mais) ao longo de todas as trajetórias para cada ligante nos estados livre (A) e ligado (B). Apenas os átomos pesados (sem hidrogênios) são mostrados e os átomos de carbono de *frames* pertencentes a diferentes clusters são representados em diferentes cores. À direita de cada conjunto, é mostrada a cor utilizada para ilustrar cada cluster bem como a sua respectiva representatividade percentual relacionada a todo o conjunto das trajetórias de 20 ns (veja o texto para detalhes e discussões). ..... 56
- Figura 20. Médias de energias internas no vácuo para *frames* representativos dos clusters livres e ligados de cada ligante. Esferas de cores claras descrevem as energias médias para ligantes livres, enquanto esferas de cores escuras representa o estado ligado. As esferas azul, vermelha, cinza e amarela mostram, respectivamente, valores de energia para Gal, Sng, Lyc e Hyb. A representatividade percentual de cada cluster é mostrada acima das linhas de desvio. Unicamente para Lyc e Hyb em solução, pode notar-se a não correspondência entre o cluster menos energeticamente favorável (no vácuo) e o mais povoado (setas), sugerindo a influência dos efeitos de hidratação na estatística conformacional desses ligantes em meio aquoso. .... 57
- Figura 21. Superposição de cinco *frames* representativos dos clusters livres para Gal (A), Sng (B), Lyc (C) e Hyb (D). No caso de Lyc e Hyb, nota-se no agrupamento mais populoso 3 (presente apenas nestes ligantes) a ocorrência de "pinças d'água" que "capturam" moléculas de água de hidratação (em azul-marinho) devido a capacidade de manter HBs simultâneas (linhas tracejadas) entre os respectivos grupos hidrofílicos dos anéis aromáticos e não-aromáticos (ver texto para detalhes e discussões). .... 59
- Figura 22. Estruturas representativas de A) cluster ligado 1 de Gal; B) cluster ligado 2 de Gal; C) cluster único de Sng; D) cluster único de Hyb; E) cluster ligado 1 de Lyc; F) cluster ligado 2 de Lyc. Em todas as estruturas, os átomos C5 e C6 (o local da modificação C5-C6<sup>sp2-sp3</sup>) são destacados e os átomos envolvidos no contato entre o anel não aromático do ligante e a cadeia lateral W86 são mostrados em esferas de van der Waals transparentes. Para Gal, a transição conformacional do agrupamento 1 para 2 é acompanhada por um tombamento (flecha curva em B) do eixo central do ligante (linha violeta contínua em A e tracejada em B). As HBs importantes entre a proteína e os respectivos grupos oxigenados nos anéis aromáticos e não-aromáticos são representadas para os diferentes ligantes em seus modos de ligação distintos (linhas pretas tracejadas). Veja o texto para detalhes e discussões. .... 60
- Figura 23. Variação de RMSF do estado livre para ligado de cada átomo para todos os ligantes devidamente separados por cor como indicado à direita. As diferentes cores no fundo do gráfico indicam átomos pertencentes a regiões dos galantamínicos devidamente destacados à esquerda, com seus nomes atômicos corretamente indicados. Observa-se uma significativa perda de mobilidade na região do anel não-aromático (arroxeadas), possivelmente pelo empacotamento com o resíduo. .... 61

Figura 24. Distribuição da população resultante das trajetórias de MD para todos os ligantes no espaço de fase 2D de energia potencial *versus* RMSD em relação à pose cristalográfica de Gal. A) respectivas distribuições para os ligantes nas trajetórias livres; B) respectivas distribuições para os ligantes nas trajetórias ligadas; C) respectivas variações na energia vibratória interna do ligante ( $\Delta E_v$ ) do estado livre para o estado ligado, resultante da aproximação quasi-harmônica (ver tópico 2.6). As barras de dados e erros mostram, respectivamente, a média e os desvios padrão para  $\Delta E_v$  (os desvios foram estimados a partir de cada MD em separado e de ambas as trajetórias combinadas para cada ligante); D) respectivas diferenças na variação da energia total de mecânica molecular de ligação ( $\Delta \Delta E_{MM}$ ) para cada ligante quando os valores de  $E_{MM}$  para a Gal nos estados livres e ligados são considerados como referências ou "0". As barras de dados e erros mostram, respectivamente, as médias e os desvios sobre todos os *frames* da MD para cada ligante. Tanto em C como em D, as letras acima das linhas de desvio mostram grupos com base nas diferenças estatisticamente significativas. Veja o texto para detalhes e discussões. .... 64

Figura 25. A análise de entropia pelo método de colônia adaptada (A e B) sugere uma ordem crescente Gal, Sng, Lyc, Hyb em termos de penalidade entrópica para o entrada desses ligantes no sítio-ativo da hAChE. A entropia quasi-harmônica baseada na matriz de covariância para as coordenadas internas dos ligantes (C e D) demonstra uma ordem crescente Gal, Sng, ligantes  $\pi$  modificados em termos penalidade entrópica. As barras de dados e erros mostram, respectivamente, a média e os desvios padrão para  $\Delta S_{ho}$  (o desvio foi estimado calculando-se  $\Delta S_{ho}$  para as MDs separadas e combinadas para cada ligante). Para ambas as análises, as imagens A e C mostram a variação estimada de entropia de ligação ( $\Delta S$  em kcal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>), enquanto as imagens B e D mostram a contribuição entrópica correspondente na energia livre de ligação ( $-T\Delta S$ , onde T é a temperatura absoluta em K). Letras acima das linhas de desvio identificam os grupos de ligantes com base nas diferenças estatisticamente significativas (veja o texto para detalhes e discussões). .... 65

## Sumário

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract .....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Sumário .....	xii
<b>1 Introdução.....</b>	<b>14</b>
1.1 <i>A doença de Alzheimer</i> .....	14
1.2 <i>A hipótese colinérgica</i> .....	15
1.3 <i>A Acetilcolinesterase</i> .....	16
1.4 <i>A Galantamina e Derivados Galantamínicos</i> .....	20
1.5 <i>A Bioinformática Estrutural</i> .....	22
1.6 <i>Ferramentas de Atracamento Molecular</i> .....	24
1.7 <i>Simulações de Dinâmica Molecular</i> .....	29
1.8 <i>Metodologias de Estimativa de Entropia</i> .....	39
1.8.1 <i>A aproximação quasi-harmônica</i> .....	40
1.8.2 <i>A aproximação do espaço de fases</i> .....	42
<b>2 Metodologia.....</b>	<b>45</b>
2.1 <i>Amostragem das Estruturas Cristalográficas</i> .....	45
2.2 <i>Modelagem de GAPs, determinação do estado de protonação e parametrização dos ligantes</i> .....	46
2.3 <i>Atracamento molecular, solvatação e ionização</i> .....	46
2.4 <i>Simulações de Dinâmica Molecular</i> .....	47
2.5 <i>Análises Pós-Produção das Trajetórias de MD</i> .....	48

---

2.6	<i>Estimativas de Entropia de Ligação</i> .....	49
2.7	<i>Dados Visuais, Análises Estruturais e Estatísticas</i> .....	50
<b>3</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>52</b>
3.1	<i>Análises de Atracamento Molecular</i> .....	52
3.2	<i>Análises de RMSD e Agrupamento das Trajetórias de MD</i> .....	54
3.3	<i>Análises Estruturais das Trajetórias de MD</i> .....	58
3.4	<i>Estimativas de Entropia</i> .....	63
<b>4</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>67</b>
4.1	<i>Trabalhos Futuros</i> .....	68
<b>5</b>	<b>Bibliografia</b> .....	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Apêndice</b> .....	<b>81</b>

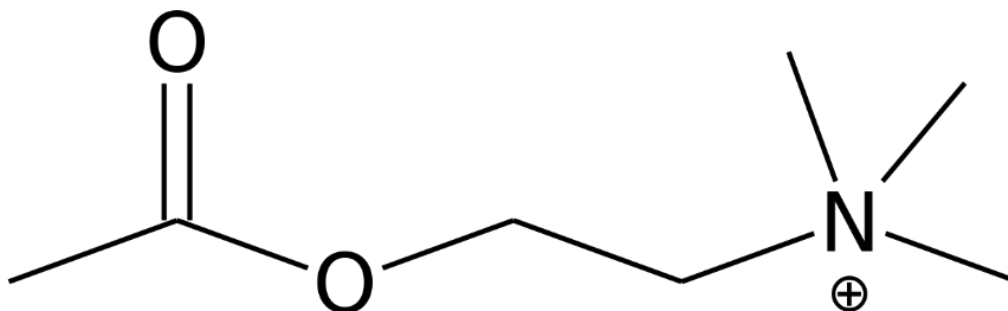
# 1 Introdução

## 1.1 A doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é atualmente um desafio à comunidade científica mundial devido a seu mecanismo complexo e seus sintomas característicos, impondo sérios problemas econômicos e de saúde pública à sociedade e seus representantes. Desde sua primeira descrição por Alois Alzheimer, em 1906, a DA já demonstrava seu potencial de afetar não somente o paciente, como também desestabilizar emocionalmente familiares e amigos do mesmo (Stelzmann, Norman Schnitzlein, and Reed Murtagh 1995). Tal característica se deve principalmente a completa descaracterização da personalidade do enfermo. Em seus estágios iniciais, o paciente geralmente apresenta cansaço, depressão e mudanças bruscas de humor, os quais evoluem para alucinações, dificuldades ao falar e agnosia. Muitos outros sinais podem ser observados em pacientes com DA, mas a autópsia do da região cerebral aponta a aglomeração de placas amilóides (ou placas senis) excessiva e emaranhados de tecido neural morto (Ikonovic et al. 2008). Atualmente, 47 milhões de pessoas são afetadas pela doença, com uma projeção de um aumento para 131 milhões de pessoas em 2050 (Prince et al. 2016). O impacto econômico da DA é estimado em 818 bilhões de dólares em nível mundial no ano de 2016, devendo ultrapassar o trilhão de dólares em 2018 (Prince et al. 2016). Tal aumento brusco no número de casos da DA se dá principalmente pelo aumento considerável da parcela populacional acima de 60 anos em praticamente todos os países (United Nations 2015). De fato, diversos estudos apontam para um aumento exponencial de casos da DA a partir dos 60 anos, chegando a observar-se uma taxa de incidência maior que 93% em pessoas com idade acima de 90 anos (Seshadri et al. 2006; Ott et al. 1998; Lobo et al. 2011). Diante desse panorama, a busca pelo entendimento do mecanismo de neurodegeneração causado pela DA, assim como o desenvolvimento de estratégias para combatê-la se tornaram um dos principais focos da comunidade científica desde o final do século XX até os dias atuais.

## 1.2 A hipótese colinérgica

Ainda hoje, o mecanismo bioquímico associado a neurodegeneração causada pela DA não é totalmente conhecido. Dentre as hipóteses mais aceitas, está a hipótese colinérgica, a qual aponta um sério lapso no sistema colinérgico de neurotransmissão oriundo da senescência e deposição de placas amiloides (ou placas senis) no interior dos neurônios (Francis et al. 1999). O sistema colinérgico é definido pela neurotransmissão mediada por acetilcolina (Ach, do inglês *acetylcholine*; Figura 1). Esse neurotransmissor é sintetizado no citoplasma dos neurônios pela colina-O-acetiltransferase, utilizando-se como substratos acetil-coenzima A e colina providos pela circulação sanguínea. Assim que sintetizada, a Ach é então estocada em vesículas sinápticas e excretada por exocitose para a fenda sináptica onde pode interagir com receptores colinérgicos (receptores nicotínicos e muscarínicos) resultando na sinalização colinérgica entre um par de neurônios. Esse sinal é finalmente cessado pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE, do inglês *acetylcholinesterase*), a qual hidrolisa a Ach em colina e acetato (Giacobini and Pepeu 2006). No entanto, a diminuição da concentração de Ach no tecido neural é característica de quadros típicos de Alzheimer (Tohgi et al. 1994). Diante disso, diversas estratégias visando aumentar a concentração desse neurotransmissor na fenda sináptica são utilizadas atualmente para tentar diminuir os sintomas típicos de pacientes com a DA (Huang and Mucke 2012). Essas estratégias são baseadas na tentativa de inibir a AchE, diminuindo a velocidade de degradação de Ach e conseqüentemente mantendo sua concentração da fenda sináptica para que esse possa interagir com os receptores colinérgicos. Porém, a complexidade e singularidade da AchE tornam as tentativas de entendimento do mecanismo de inibição dessa enzima um desafio para a comunidade científica.



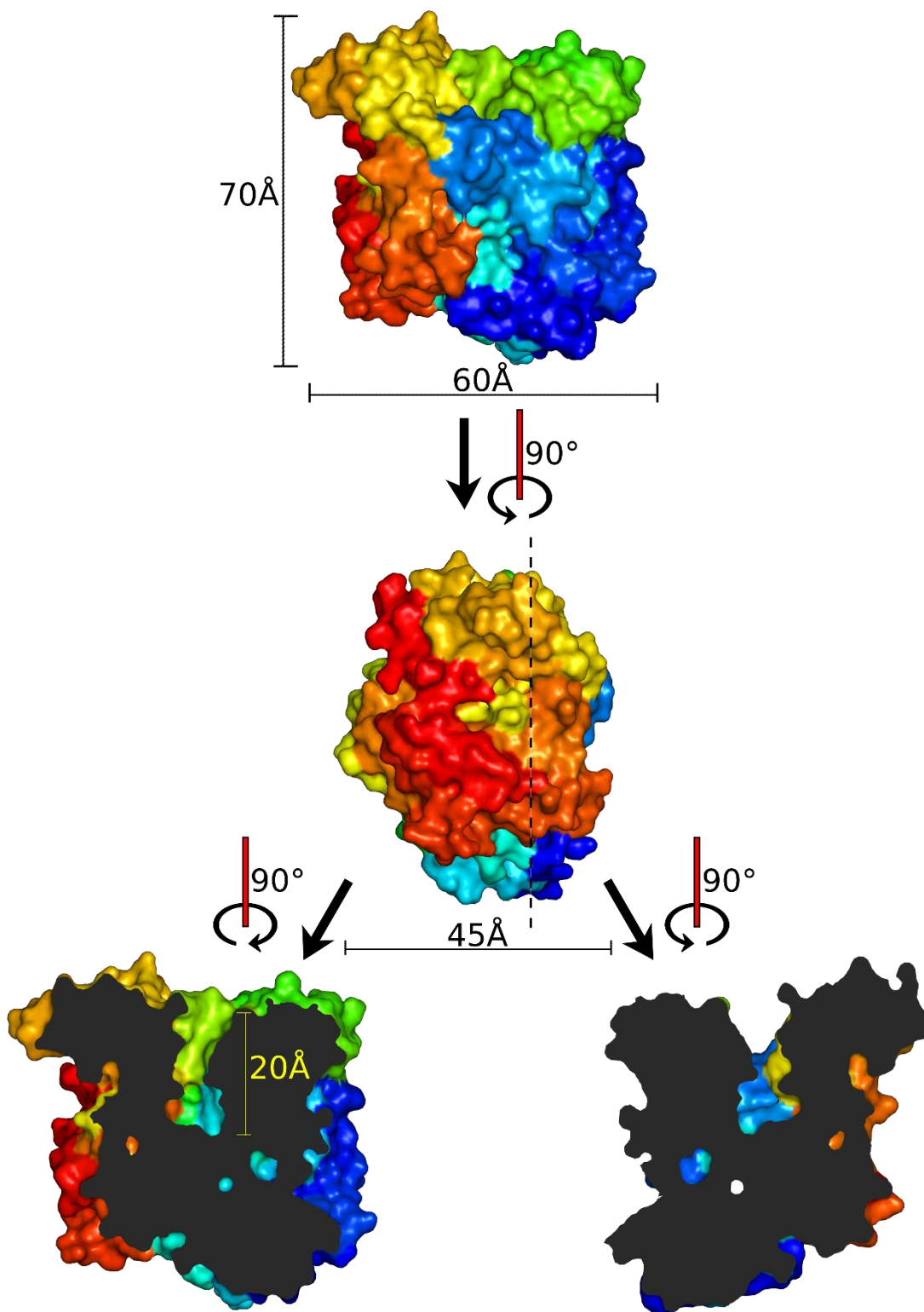
**Figura 1.** Estrutura molecular da Ach, molécula chave para a via colinérgica de neurotransmissão. Imagem estrutural obtida segundo metodologia apresentada.



### 1.3 A Acetilcolinesterase

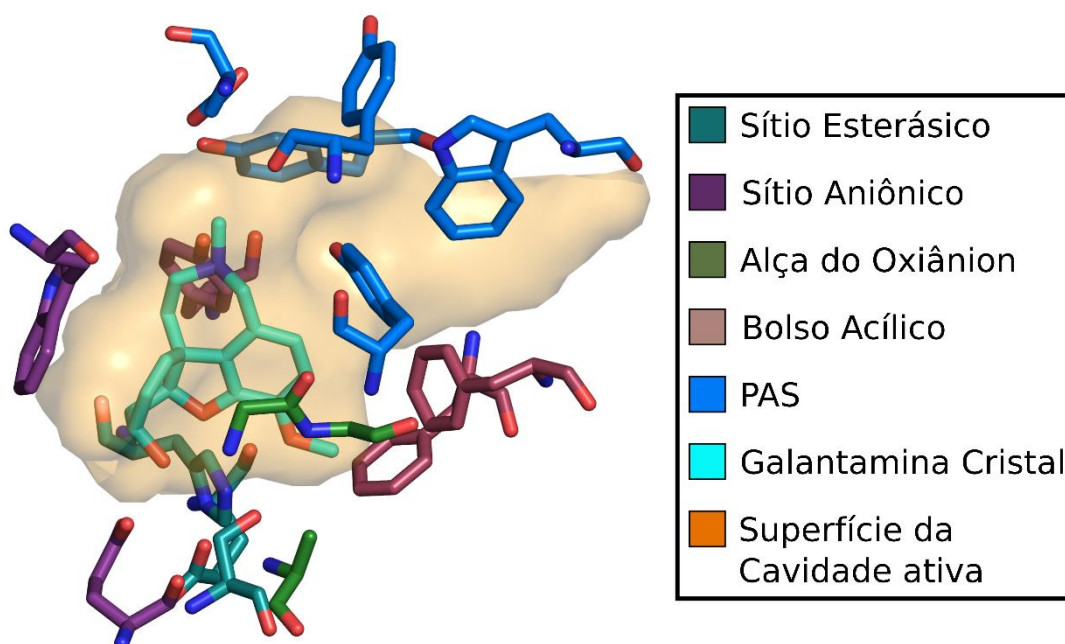
A AchE é uma serino-hidrolase pertencente às colinesterases, uma família enzimática amplamente conservada em diversos organismos encéfalos, sugerindo uma grande importância no correto funcionamento do sistema nervoso (P. Taylor and Radic 1994; Pezzementi, Nachon, and Chatonnet 2011). De fato, essa enzima é amplamente encontrada no tecido neural central, periférico, nos nervos e nos músculos, com uma atividade maior em neurônios motores (Colovic et al. 2013). A AchE é enquadrada na categoria de enzimas perfeitas, com um número de renovação de segunda ordem ( $K_m/K_{cat}$ ) maior que  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , demonstrando uma altíssima afinidade da Ach pelo sítio-ativo da AchE (Quinn 1987; Dvir et al. 2010). Sua estrutura é extensamente relatada, de modo que a busca pelo termo “acetylcholinesterase” no Protein Data Bank (PDB, o principal banco de dados de estruturas cristalográficas de proteínas) retorna mais de 200 estruturas depositadas nesse banco de dados, oriundas de diversos organismos, desde *Drosophila melanogaster* à AchE humana (hAchE). Essa última apresenta uma estrutura globular dimérica com cerca de 60 kDa e um tamanho de cerca de  $60 \times 70 \times 45 \text{ \AA}$  por monômero (Figura 2). Sua cavidade ativa estreita apresenta uma profundidade de aproximadamente  $20 \text{ \AA}$  com uma “garganta” rica em resíduos aromáticos que termina na tríade catalítica (ou sítio esterásico) definida pelos resíduos S203, H447 e E334 (Cheung et al. 2012; Figura 3).

Tais resíduos conferem à hAchE um mecanismo enzimático em dois passos, onde em uma primeira etapa (acilação) o resíduo de serina realiza um ataque nucleofílico no carbono do grupamento éster da Ach graças a doação de um próton da serina para resíduo de histidina. Após a formação da acil-enzima, a serina é restabelecida por hidrólise mediada pelo resíduo H447 (desacilação) no segundo passo da reação (Cheung et al. 2012; Quinn 1987). A cavidade catalítica ainda apresenta diversos subsítios importantes para a correta coordenação do substrato em direção a tríade catalítica (Figura 3). O sítio aniônico, delimitado pelos resíduos W86, Y337 e E202, é negativamente carregado e tem como função a mobilização da extremidade amina da Ach para o acoplamento da extremidade éster no sítio esterásico (Quinn 1987; Dvir et al. 2010). De fato, esses resíduos demonstram extrema importância para a atividade



**Figura 2.** Estrutura tridimensional de hAChE (código PDB 4EY6) em diversas disposições espaciais, colorida em gradiente por proximidade às extremidades em termos de estrutura primária (azul = amino-terminal, vermelho = carboxi-terminal). As dimensões aproximadas da proteína são apresentadas para todos os eixos por barras pretas. A altura aproximada da cavidade ativa é apresentada por barra amarela. Eventuais rotações na proteína são indicadas por barras vermelhas e a direção dessa rotação é indicada por setas circulares pretas. A linha tracejada preta indica corte transversal na estrutura proteica para melhor visualização do sítio-ativo. As imagens estruturais foram obtidas segundo metodologia apresentada.

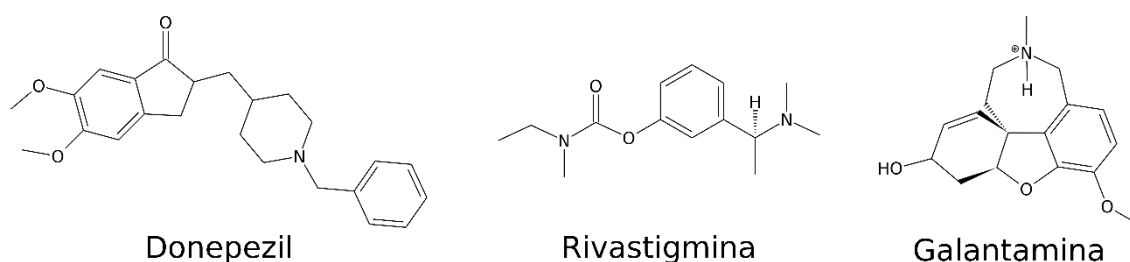
catalítica da enzima, de modo a induzir diminuição da atividade desta e aumento da resistência a inibição por iodeto de propídio quando mutados (Barak et al. 1995; Ariel et al. 1998). O resíduo W86 em especial apresenta-se amplamente conservado em AchE de organismos totalmente diferentes, em outras proteínas da família das colinesterases e em receptores colinérgicos membranares, sugerindo uma grande importância da orientação aromática mediada por esse resíduo para o reconhecimento do substrato e eventuais inibidores (ver Resultados e Discussões para mais detalhes; Pezzementi, Nachon, and Chatonnet 2011; Taylor and Radic 1994). Outro subsítio importante é denominado alça do oxiânion e delimitado pelos resíduos G121, G122 e A204 (Zhang, Kua, and McCammon 2002). A mutação desses resulta em uma diminuição de 100x das constantes de velocidade enzimática em hAChE, sugerindo vital importância para a estabilidade dos intermediários catalíticos na degradação de Ach (Ordentlich et al. 1998). A complementaridade da AchE pelo seu substrato é amplamente mediada pelo bolso acílico, uma região próxima ao sítio esterásico delimitada pelos resíduos F295 e F297, os quais induzem uma perda de especificidade pela Ach quando mutados (Pezzementi et al. 2003). É importante realçar também a existência do sítio aniônico periférico (PAS, do inglês *Peripheral Anionic Site*), delimitado pelos resíduos Y72, Y124,



**Figura 3.** Detalhamento tridimensional da cavidade ativa de hAChE (código PDB 4EY6) com posicionamento experimental da Gal (azul ciano) e resíduos importantes para o reconhecimento desse inibidor, todos representados como *sticks*. A superfície interna da cavidade é apresentada em laranja usando visualização do tipo *surface*. As imagens estruturais foram obtidas segundo metodologia apresentada.

W286, Y341 e D74 (Lavorato 2012). Tal subsítio localiza-se na entrada da cavidade catalítica e vem sendo associado a formação de placas amiloides no citoplasma de neurônios motores (Inestrosa et al. 1996).

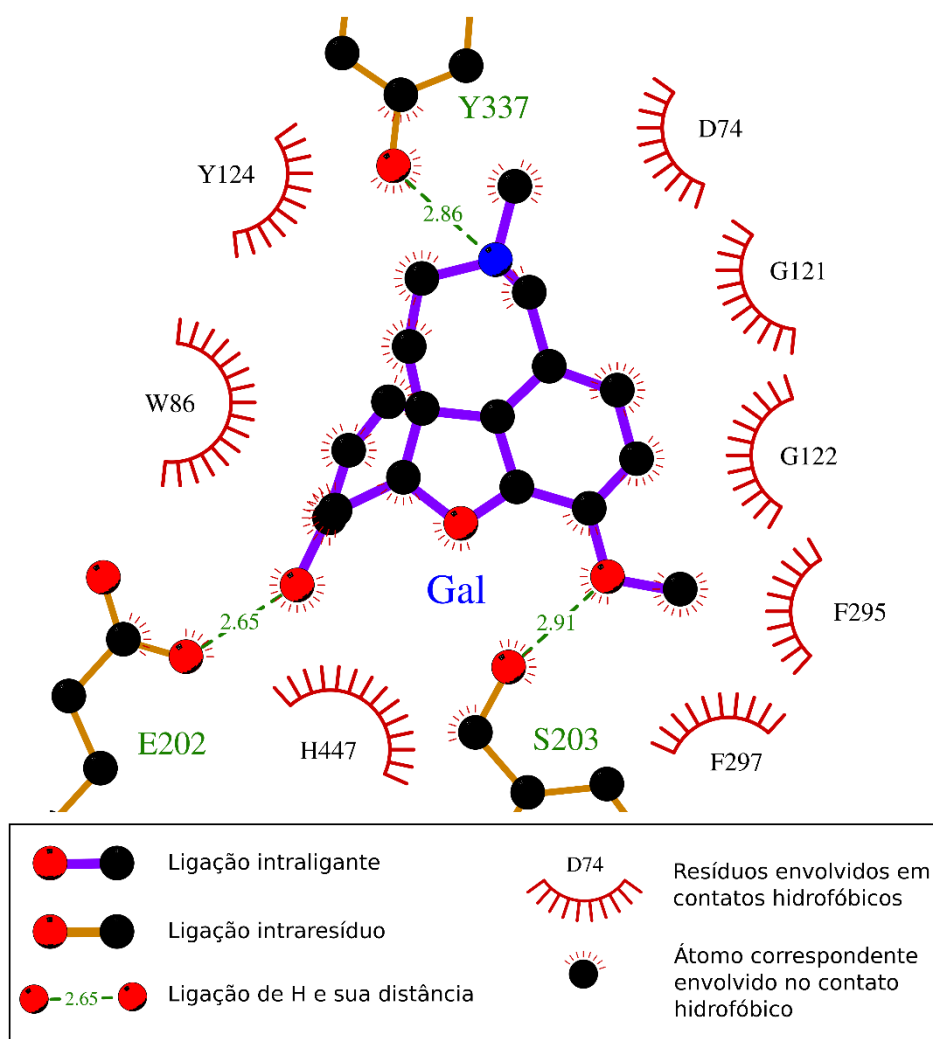
A riqueza em resíduos de fenilalanina, histidina e triptofano ao longo da cavidade catalítica abre brecha para a utilização de compostos aromáticos na inibição da AchE. De fato, todos os medicamentos naturais para o tratamento paliativo da DA atualmente aprovados são caracterizados pela presença de anéis aromáticos (Figura 4). O donepezil (Eranz<sup>®</sup> ou Aricept<sup>®</sup>) é uma piperidina e um inibidor reversível de AchE que interage fortemente com os resíduos W86 e W286 através de empacotamento aromático (Rodrigues Simoes et al. 2014). Tal medicamento parece melhorar a cognição e recuperar o comportamento normal de pacientes tratados principalmente nos estágios inicial e intermediário da doença (Grossberg 2003). A prescrição de donepezil deve ser realizada com precaução em pacientes cardiopatas, com DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) e outros quadros clínicos comuns a sexagenários. Efeitos colaterais podem variar entre vômitos, insônia, perda de apetite, câimbra entre outros (Mimica and Presecki 2009). A rivastigmina (Exelon<sup>®</sup>) é um fenil carbamato com modo de ligação análogo a Ach na cavidade ativa da AchE (Jann 2000). Este medicamento, quando administrado nas fases inicial e intermediária da DA, resulta em um melhoramento das atividades cognitivas e funcionais do paciente, apesar de poder induzir a vômitos, perda de apetite e de peso (Ali et al. 2015; Mimica and Presecki 2009). Dentre os inibidores naturais de AchE, o mais promissor deles é a galantamina (Gal)(Nivalin<sup>®</sup>), com diversos estudos apontando sua eficácia no tratamento de doenças neurodegenerativas (Gaudig et al. 2011; Richarz et al. 2012; Erkinjuntti et al. 2002; Wilcock, Lilienfeld, and Gaens 2000).



**Figura 4.** Estruturas moleculares dos principais inibidores naturais de hAChE utilizados para o tratamento paliativo da DA. Note a presença de anéis aromáticos em todos eles. Imagens estruturais obtidas segundo metodologia apresentada.

## 1.4 A Galantamina e Derivados Galantamínicos

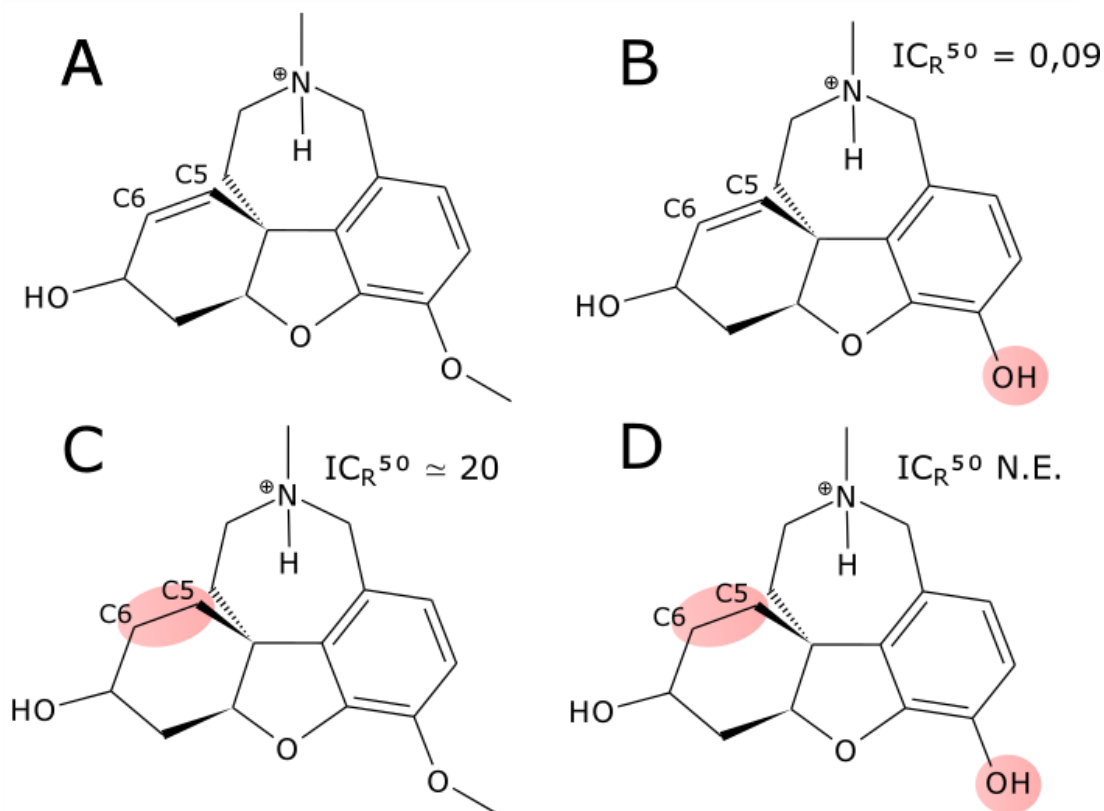
A Gal é um alcalóide encontrado em plantas do gênero *Galanthus* (Marco and Carreiras 2012). Seus efeitos colaterais no tratamento de doenças neurodegenerativas são leves e transientes, ocorrendo geralmente no início do tratamento e podendo incluir náuseas, dispepsia, vômitos e diarreia (Mimica and Presecki 2009; Mohammad et al. 2017). Quando purificada, a Gal apresenta-se como um pó branco em temperatura ambiente com alta solubilidade em água (10mg/mL) e uma massa molecular de 288.36u (em sua forma protonada). Sua estrutura altamente anelada é rica em farmacóforos. Dentre eles, deve-se notar o grupamento hidroxila ligado ao anel de seis membros não-aromático, o qual foi relatado como doador para uma ligação de hidrogênio com o resíduo E202 do sítio aniônico em hAChE (Figura 5; Cheung et al. 2012). Um



**Figura 5.** Padrão de contatos para a Gal (roxo) experimental obtida do complexo cristalográfico hAChE-Gal (código PDB 4EY6). Notar interações de empilhamento com resíduo W86. Imagem obtida segundo metodologia apresentada.

empacotamento entre o resíduo W86 e esse anel parece ser também uma interação chave para a afinidade da Gal. No outro extremo da molécula, interações hidrofóbicas entre o grupamento metóxi da Gal e o resíduo F297 surgem em estudos do complexo cristalográfico hAChE-Gal (Figura 5; Cheung et al. 2012).

Tal padrão de interação torna a Gal um inibidor reversível de AchE, com um poder inibitório por volta de 1  $\mu\text{M}$  em  $\text{IC}_{50}$  (López et al. 2002). Outros ligantes derivados de galantamina, aqui chamados de galantamínicos, foram relatados com atividade inibitória frente a AchE. Dentre eles, destaca-se a sanguinina (Sng; Figura 6-B), um galantamínico cuja única diferença comparada a Gal é a substituição do grupo metóxi por um grupo hidroxil (aqui chamada substituição metóxi-hidróxi). Essa única substituição confere a Sng um  $\text{IC}_{50}$  de 0,1  $\mu\text{M}$ , um poder inibitório 10 vezes maior que Gal, tornando a Sng um potencial e otimizado medicamento anti-Alzheimer (López et al. 2002). Outro galantamínico de destaque é a licoramina (Lyc, do inglês *lycoramine*; Figura 6-C), cuja diferença reside na retirada da ligação  $\pi$  presente no anel não aromático de seis membros entre os carbonos C5 e C6 (aqui chamada substituição  $\text{C5-C6}^{\text{sp}2\text{-sp}3}$ ), resultando em um poder inibitório cerca de 20 vezes menor que Gal (R. L. Irwin and Smith 3rd 1960). Um melhor entendimento dos efeitos moleculares promotores de tais distintas diferenças de inibição pode contribuir para o planejamento mais racional de novos medicamentos anti-Alzheimer. Diante disso e na tentativa de observar-se eventuais efeitos cumulativos dessas modificações no cerne galantamínico, uma molécula híbrida de Lyc e Sng, aqui chamada de Hyb, foi modelada computacionalmente, a qual conta tanto com a substituição metóxi-hidróxi (presente em Sng) quanto a modificação  $\text{C5-C6}^{\text{sp}2\text{-sp}3}$  (presente em Lyc; Figura 6-D). Para rápida referência ao longo texto, optamos por referenciar Gal e Sng ao mesmo tempo como ligantes  $\text{C5-C6}^{\text{sp}2}$ , enquanto que Lyc e Hyb são referenciados como ligantes  $\text{C5-C6}^{\text{sp}3}$ . A observação de mecanismos inibitórios em nível molecular, no entanto, não é facilmente atingível por metodologias *in vitro*, obrigando a comunidade acadêmica a lançar mão de técnicas computacionais para tentar explicá-los. Nesse contexto, surge a Bioinformática Estrutural, uma área ampla e em grande expansão, mas que terá apenas as técnicas interessantes a esse trabalho detalhadas aqui.



**Figura 6.** Fórmula estrutural de A) Gal; B) Sng; C) Lyc; D) Hyb, destacando as diferenças químicas em cada ligante em relação a Gal. O  $IC_{50}$  relativo ( $IC_{R50}$ ) é obtido dividindo-se o valor de  $IC_{50}$  encontrado na literatura para os ligantes derivados pelo valor de  $IC_{50}$  da Gal. Os dados de  $IC_{R50}$  para Hyb não foram encontrados (N.E.) na literatura. Os carbonos envolvidos na modificação C5-C6<sup>sp2-sp3</sup> são destacados em todos os ligantes. Imagens estruturais obtidas segundo metodologia apresentada.

## 1.5 A Bioinformática Estrutural

A busca por metodologias que permitam o entendimento molecular de processos bioquímicos a nível molecular, o qual é dificilmente alcançado por metodologias de bancada, pressionou o desenvolvimento da bioinformática estrutural. Essa vasta área pode ser compreendida como um ramo da bioinformática que se vale a analisar e/ou prever estruturas tridimensionais de biopolímeros em geral. Isto permeia a investigação de motivos estruturais, enovelamento, padrões de interação, relação estrutura-função, etc. de estruturas geralmente resolvidas experimentalmente. Os modelos resolvidos em bancada são usualmente depositados em bancos de dados de estruturas e disponibilizados para a comunidade científica. O banco de dados mais relevante no contexto do atual trabalho é o PDB, um servidor on-line com estruturas proteicas resolvidas, em sua maioria, por difração de raios-x (Berman et al. 2002). Nele

é possível obter-se arquivos de coordenadas para diversas proteínas, incluindo-se a AchE. Estes arquivos contêm informações devidamente organizadas e padronizadas de cada átomo presente na estrutura resolvida, como as coordenadas tridimensionais do ponto central de cada átomo, o tipo de resíduo de aminoácido ao qual determinado átomo pertence, o número desse resíduo e o tipo atômico no qual este átomo se adequa. Esta última distinção mostra-se especialmente importante para as análises descritas a frente, e parte do pressuposto de que uma determinada espécie atômica (por exemplo oxigênio, ou simplesmente O) pode apresentar comportamento distinto dependente do contexto de ligação no qual pertence. Isto significa que diferentes nomenclaturas são associadas a um O presente em um grupo hidroxil e a um O presente num grupo etoxi. Isto permite uma fácil separação de quais átomos participam de quais interações, como por exemplo, interações de hidrogênio (HB, do inglês *Hydrogen Bond*), onde o segundo tipo atômico exemplificado pode participar apenas como acceptor. As informações contidas neste arquivo podem ser então interpretadas por programas de visualização que convertem tais informações em figuras tridimensionais interativas que permitem a inspeção visual em nível atômico de estruturas de proteínas e outros biopolímeros, seus eventuais ligantes e outras moléculas comumente encontradas nesses tipos de sistemas (Delano 2002; Humphrey, Dalke, and Schulten 1996).

Diante das informações das coordenadas das estruturas é possível então realizar uma pluralidade de análises úteis no dia-a-dia de um bioinformata, dentre elas as análises de RMSD (do inglês *root mean square deviation*, ou desvio quadrático médio), dado pela equação 1:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|v_i - w_i\|^2} \quad .(1)$$

onde n indica o número total de pares de átomos comparados,  $v_i$  o posicionamento tridimensional do átomo i e  $w_i$  o posicionamento do átomo análogo ao i na segunda estrutura. Tal análise é geralmente utilizada para a verificação da proximidade estrutural entre duas ou mais amostras, utilizando-se as coordenadas de todos ou determinadas átomos de cada estrutura e resultando em uma grandeza facilmente comparável.



A manipulação dessas coordenadas é também base para diversas análises mais robustas, as quais visam descrever sistemas biomoleculares ao ponto de obter-se grandezas que possam indicar a favorabilidade ou não desses. Logo, um maior detalhamento desses tipos de análises que tenham interesse no presente trabalho faz-se necessário.

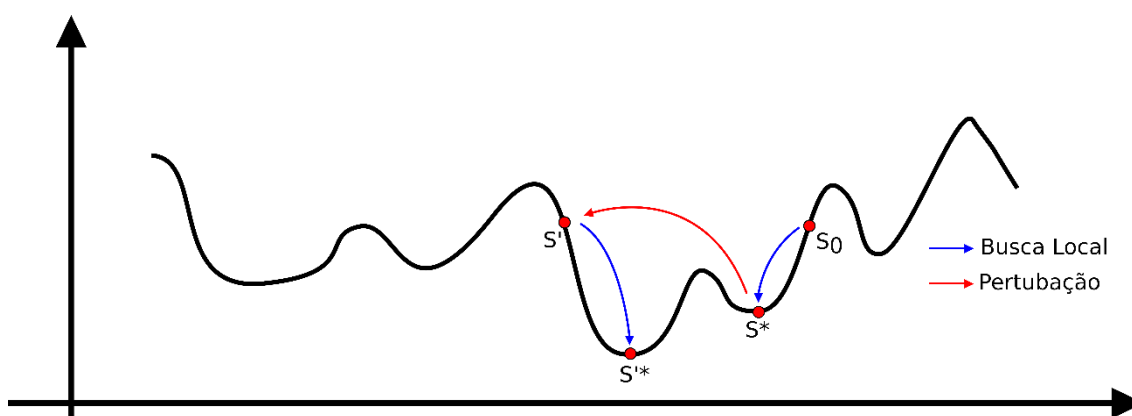
## 1.6 Ferramentas de Atracamento Molecular

Representadas por uma pluralidade de *softwares*, ferramentas de atracamento molecular são amplamente utilizadas em diversos trabalhos de bioinformática estrutural, incluindo desde a otimização de poses ligantes (geralmente uma pequena molécula com potencial inibitório) em cavidades de interesse de um receptor (geralmente uma proteína não estrutural), até a utilização dessas como filtros para seleção de potenciais inibidores dentre uma variedade de moléculas (conhecido como *virtual screening*; Priya et al. 2015; Ferreira et al. 2010). Comumente, tais ferramentas funcionam amostrando poses do ligante em um espaço determinado do receptor rígido, seguindo uma lógica de otimização onde cada pose é avaliada e ranqueada segundo uma função de avaliação (ou do inglês *Scoring Function*; Dastmalchi and Siavoush 2016). O algoritmo de amostragem das poses do ligante e a função de avaliação variam amplamente de acordo com o *software* utilizado, mas habitualmente seguem a mesma ideia geral (Morris et al. 2009; de Magalhães et al. 2014; Jones et al. 1997; Halgren et al. 2004). Para as análises de atracamento molecular deste trabalho, o *software* Autodock Vina versão 2.2.0 foi utilizado, tornando pertinente o aprofundamento no funcionamento do mesmo (Trott and Olson 2010). Neste *software*, um algoritmo de Busca Local Iterada (ILS, do inglês *Iterated Local Search*) para a otimização global é utilizado para fornecer cada amostra do posicionamento do ligante e segue passos relativamente simples de funcionamento (Salari 2013):

- para solução inicial  $S_0$  (um posicionamento aleatório do ligante por exemplo), uma busca local é realizada a procura de eventuais mínimos na vizinhança gerando  $S^*$ , um vizinho mais favorável de  $S_0$ ;
- caso o critério de parada não seja atingido, uma perturbação é aplicada a  $S^*$  levando-se em conta seu histórico, gerando  $S'$ ;

- uma busca local é realizada em  $S'$  para gerar  $S'^*$ , um vizinho mais favorável de  $S'$ ;
- com o critério de parada atingido,  $S^*$  e  $S'^*$  são avaliados e aceitos ou não;
- repete-se o algoritmo para outros posicionamentos iniciais aleatórios.

Um esquema simplificado desses passos é apresentado na Figura 7. No caso do Autodock Vina, a busca local realizada para encontrar um eventual vizinho mais favorável é desempenhada por um método quasi-Newtoniano de otimização denominado método Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS; Head and Zerner 1985) Tal metodologia baseia-se na aplicação da função de avaliação para um ponto amostrado e, de acordo com a “energia” retornada por essa função, um “torque” é realizado no ligante de forma a favorecer determinadas rotações e translações internas e externas.



**Figura 7.** Esquema simplificado do algoritmo ILS para otimização de poses. O mesmo utiliza combinação de buscas locais (setas azuis) e perturbações (seta vermelha) para varrer o espaço conformacional de um ligante no sítio-ativo de uma proteína (ver texto para mais detalhes).

Em termos de função de avaliação, os autores do AutoDock Vina optaram por um método híbrido (empírico/teórico) inspirado na função *X-score*, diferindo-se deste principalmente nos termos de restrições internas e no método de parametrização (R. Wang, Lai, and Wang 2002). Tal função resulta na energia livre de ligação para cada pose avaliada, e é simplificada descrita pela equação 2:

$$\Delta G = \Delta G_{VDW} + \Delta G_{ponte-de-H} + \Delta G_{deformacao} + \Delta G_{hidrofobico} + \Delta G_0 \quad .(2)$$

Essa metodologia assume que toda a energia livre de ligação de um processo de interação proteína-ligante é suficientemente descrita apenas pelos termos de contatos

de van der Waals ( $\Delta G_{VDW}$ ), de HBs ( $\Delta G_{ponte-de-H}$ ), efeitos de deformação ( $\Delta G_{deformação}$ ), efeitos hidrofóbicos ( $\Delta G_{hidrofóbico}$ ) e implicitamente pela perda de entropia rotacional e translacional externa ( $\Delta G_0$ ). Neste caso, a interação de van der Waals (vdW) é dada pela equação de Lennard-Jones (LJ) simplificada (Eq. 3),

$$VDW = \sum_i^{Ligante} \sum_j^{Proteina} \left[ \left( \frac{d_{ij,0}}{d_{ij}} \right)^8 - 2 \left( \frac{d_{ij,0}}{d_{ij}} \right)^4 \right] \quad .(3)$$

onde  $d_{ij,0}$  representa a soma dos raios de vdW de um átomo  $i$  do ligante e um átomo  $j$  do receptor e  $d_{ij}$  representa a distância interatômica entre esses dois átomos. Apenas átomos pesados são considerados para esse fim e seus raios são determinados segundo seus tipos atômicos.

HBs são contabilizadas utilizando-se apenas parâmetros geométricos de distância e ângulos segundo a equação 4,

$$HB_{ij} = f(d_{ij})f(\theta_{1,ij})f(\theta_{2,ij}) \quad .(4)$$

onde  $d_{ij}$  representa a distância interatômica entre átomo doador e acceptor,  $\theta_{1,ij}$  o ângulo resultante entre o átomo ligado ao doador, o átomo doador e o átomo acceptor (aqui chamado ângulo AD-D-A) e  $\theta_{2,ij}$  o ângulo resultante entre o átomo doador, o átomo acceptor e o átomo ligado ao acceptor (aqui chamado ângulo D-A-AA). A equação 4 impõe que, para a computação de uma HB, todas as condições de distância e ângulos devem ser satisfeitas ao mesmo tempo, seguindo as regras presentes nas equações 5, 6 e 7.

$$f(d) = \begin{cases} 1 & \text{se } d \leq d_0 - 0,7\text{Å} \\ (1/0,7)(d_0 - d) & \text{se } d_0 - 0,7\text{Å} < d \leq d_0 \\ 0 & \text{se } d > d_0 \end{cases} \quad .(5)$$

$$f(\theta_1) = \begin{cases} 1 & \text{se } \theta_1 \geq 120^\circ \\ (1/60)(\theta_1 - 60) & \text{se } 120^\circ > \theta_1 \geq 60^\circ \\ 0 & \text{se } \theta_1 < 60^\circ \end{cases} \quad .(6)$$

$$f(\theta_2) = \begin{cases} 1 & \text{se } \theta_2 \geq 120^\circ \\ (1/60)(\theta_2 - 60) & \text{se } 120^\circ > \theta_2 \geq 60^\circ \\ 0 & \text{se } \theta_2 < 60^\circ \end{cases} \quad (7)$$

Logo nota-se que os posicionamentos dos hidrogênios também não são considerados no cálculo das HBs, permitindo a aplicação da função de avaliação mesmo para estruturas cristalográficas (R. Wang, Lai, and Wang 2002; Padhye et al. 2009). As funções acima permitem ainda a computação de HBs com algum desvio tanto de distância, quanto de ângulos mas com uma penalidade pesada por esses desvios. Porém, nesse cálculo, o mesmo peso é aplicado para HBs que envolvem oxigênio-oxigênio, oxigênio-nitrogênio e nitrogênio-nitrogênio.

Efeitos de deformação são contabilizados segundo a somatória do número de rotores internos do ligante. Esse termo surge da admissão de que existirá uma maior penalidade para ligantes estruturalmente mais móveis durante o enclausuramento do mesmo na cavidade do receptor. Para isso, em um dado átomo  $i$  do ligante, seu fator rotacional ( $RT_i$ ) torna-se igual a 0 quando este não está envolvido em nenhum rotor, 0,5 quando envolvido em 1 rotor, 1 quando envolvido em 2 rotores e 0.5 quando envolvido em mais de 2 rotores. Segundo os autores, esse valor de  $RT_i$  para átomos envolvidos em mais de 2 rotores se dá pela superestimação da contribuição desses efeitos na energia de ligação do complexo (R. Wang, Lai, and Wang 2002). De fato, apesar de ser uma aproximação muito ampla, ligantes móveis podem conservar parte de sua mobilidade quando complexados (Ni, Sotriffer, and McCammon 2001).

Efeitos hidrofóbicos na energia final de ligação são contabilizados segundo três algoritmos na função de avaliação em questão:

- somatória da superfície acessível ao solvente (SAS) de cada átomo do ligante, onde simplificadaamente, uma sonda de raio 1.5Å (representando o solvente) varre o espaço externo da proteína, resultando na SAS do receptor através da integração numérica dos pontos onde a sonda conseguiu se encaixar sem impedimento dos raios atômicos do receptor (Connolly 1983). Uma penalidade

é então aplicada a qualquer átomo hidrofóbico do ligante que penetre essa superfície;

- somatória dos contatos hidrofóbicos envolvendo pares de átomos não-hidrogenóides do ligante e receptor. A cômputo de um contato hidrofóbico é realizado levando-se em conta apenas a distância do par e é dado pela equação 8,

$$f(d) = \begin{cases} 1 & \text{se } d \leq d_0 + 0,5\text{\AA} \\ (1/1,5)(d_0 + 2 - d) & \text{se } d_0 + 0,5\text{\AA} < d \leq d_0 + 2\text{\AA} \\ 0 & \text{se } d > d_0 + 2\text{\AA} \end{cases} \quad .(8)$$

onde  $d_0$  indica a soma dos raios atômicos do par de átomos e  $d$  indica a distância interatômica entre eles. Novamente, um contato ainda pode ser computado com um certo desvio, admitindo-se que essa interação diminui sua contribuição para a energia de ligação conforme determinado par atômico se distancia, tornando-se praticamente nula a distâncias maiores que 2Å.

- somatório da coincidência hidrofóbica de cada átomo do ligante (HM, do inglês *Hydrophobic Matching*). Esse termo surge da admissão de que existe uma favorabilidade da acomodação de um átomo hidrofóbico do ligante em um ambiente também hidrofóbico da cavidade do receptor e uma penalidade para o caso contrário (Rarey, Kramer, and Lengauer 1999). Cada tipo atômico é então encaixado e uma escala de hidrofobicidade e cada átomo do ligante é avaliado perante sua vizinhança. Caso um átomo muito hidrofóbico do ligante esteja sob um ambiente muito hidrofóbico, HM recebe 1. Caso um átomo muito hidrofóbico do ligante esteja sob um ambiente muito hidrofílico ou um átomo muito hidrofílico do ligante esteja sob um ambiente muito hidrofóbico, HM recebe 0. Obviamente, existe todo um leque de possibilidades de arranjos átomo/ambiente em termos de hidrofobicidade entre 0 e 1, permitindo que sejam aplicadas maior ou menor relevância para átomos ou ambientes mais ou menos hidrofóbicos.

Os autores do AutoDock-Vina ainda adicionaram termos repulsivos estéricos sobre a função de avaliação do *X-score* (Trott and Olson 2010), mas mesmo com esse

melhoramento, é fácil de perceber-se que várias aproximações distanciam as análises de docking de um sistema real sendo as mais notórias delas:

- a adoção de um receptor rígido em sua totalidade ou parcialidade (o AutoDock-Vina permite a flexibilização das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos determinados pelo usuário). De fato, a adoção de diferentes conformações pelo receptor pode ser um fator chave para a correta ligação de seus ligantes (Brooks and Karplus 1983);
- a inexistência de termos que relevem eventuais contribuições internas entre os átomos do ligante, os quais já foram relatados como um importante fator para a afinidade de ligantes e como ver-se-á no atual trabalho (Kirschner and Woods 2001).
- aproximações rasas dos termos entálpicos e entrópicos envolvidos na energia de ligação do complexo, os quais demandam metodologias mais rigorosas de análise (Miller 3rd et al. 2012; Andricioaei and Karplus 2001; Izrailev et al. 1997).

Tais limitações surgem da necessidade da implementação de algoritmos mais rápidos na análise das interações ligante/receptor, tornando a metodologia de atracamento molecular uma excelente ferramenta na análise de um número grande de sistemas ou para a geração de poses de ligantes dos quais não se conhece a conformação adotada em determinada cavidade de determinado receptor. Essa última finalidade é amplamente utilizada quando se necessita gerar uma pose inicial para análises mais robustas como a Dinâmica Molecular (MD, do inglês *Molecular Dynamics*; Kruse et al. 2012; Martínez and Martínez 2003). Esse foi justamente o objetivo da utilização de metodologias de atracamento neste trabalho.

## 1.7 Simulações de Dinâmica Molecular

MDs são ferramentas de bioinformática estrutural que visam descrever um sistema molecular segundo suas características temporais. Isso indica um grau de complexidade acima das metodologias de docking molecular, tanto em termos teóricos, quanto em poder computacional exigido. Desse modo, a capacidade de observação do comportamento de nanobiosistemas ao longo do tempo habilita a MD a prover

observações mais robustas acerca dos mesmos, resultando em uma multiplicidade de trabalhos que utilizam tais ferramentas para as mais diversas finalidades. De fato, é relatado a utilização de MDs para entendimento dos processos de enovelamento de peptídeos (Ho and Dill 2006), termoestabilidade de proteínas (Manjunath and Sekar 2013), estabilidade e estruturação de ácidos nucleicos (Beveridge et al. 2004), interação membrana-proteína (Johansson and Lindahl 2006), interação antígeno-anticorpo (Brandt et al. 2016), além de muitos outros processos bioquímicos. Frequentemente MDs são utilizadas também para o entendimento molecular da interação enzima-ligante (N. R. Taylor and von Itzstein 1994; Huo et al. 2002; Vettoretti et al. 2016), permitindo a geração mais apurada de grandezas que regem tal processo. Assim sendo, tais ferramentas foram escolhidas neste trabalho como centrais para a um melhor entendimento da interação entre os inibidores de hAChE (anteriormente discutidos) e esta enzima. Logo se faz necessário um pouco de aprofundamento nos conceitos que envolvem tais ferramentas assim como o seu funcionamento.

Um algoritmo de MD tem como objetivo a integração numérica e sistemática da equação de movimento de Newton (equação 9) para cada átomo de um sistema pré-definido ao longo de um tempo determinado pelo usuário (Phillips et al. 2005).

$$m_{\alpha} \vec{r}_{\alpha} = -\frac{\partial}{\partial \vec{r}_{\alpha}} U_{total}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N), \alpha = 1, 2, \dots, N \quad .(9)$$

A equação 9 indica que, para um dado átomo  $\alpha$  do sistema, para conhecer-se sua posição  $r_{\alpha}$ , é necessário conhecer sua massa  $m_{\alpha}$  assim como a energia potencial total  $U_{total}$  que é incidida sobre esse átomo por todos os demais átomos. A massa atômica é tabelada e determinada pelo tipo atômico do átomo analisado, restando à determinação da energia potencial toda a complexidade inerente a uma MD. Para a determinação deste termo, foram desenvolvidas equações de energia potencial conhecidas como “campos de força” (FFs, do inglês *Force Fields*), os quais assumem, em geral, que todas as forças incidentes sobre um átomos são oriundas das energias de ligação ( $U_{lig}$ ), de distorção angular ( $U_{ang}$ ), de distorção de diedros próprios e impróprios ( $U_{died}$  e  $U_{impr}$ , respectivamente), de vdW ( $U_{vdW}$ ) e Coulombicas ( $U_{Coulomb}$ ) segundo a equação 10:

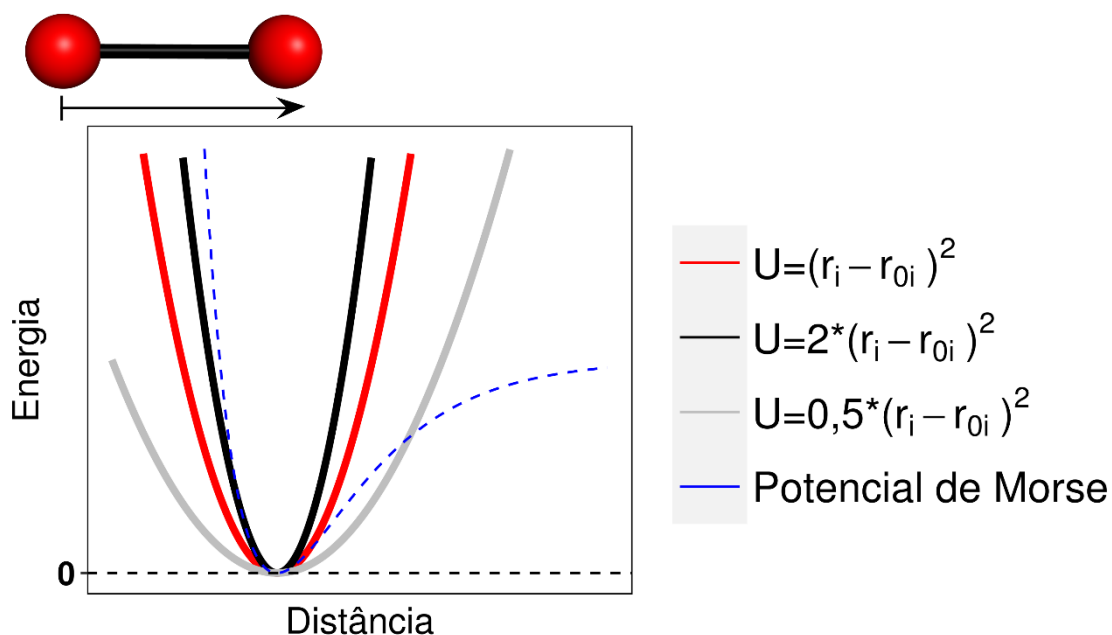
$$U_{total} = U_{lig} + U_{ang} + U_{died} + U_{impr} + U_{vdW} + U_{Coulomb} \quad .(10)$$

Os quatro primeiros termos da energia potencial total são exclusivos para interações entre átomos ligados direta ou indiretamente e juntos resultam nas denominadas energias ligadas. Os dois últimos são resultantes de interações entre pares não ligados a menos de 4 átomos, e juntos formam as energias não-ligadas. Todos os termos juntos constituem a forma mais comum de FFs e pequenas nuâncias podem existir dentre os softwares de integração, como o GROMACS, AMBER e NAMD (Berendsen, van der Spoel, and van Drunen 1995; Case et al. 2005; Phillips et al. 2005), sendo este último o programa de simulação escolhido para as análises de MD neste trabalho. No entanto, um olhar mais atento em cada termo que constitui a energia potencial total nos permite observar limitações das ferramentas de MD e cuidados que devem ser tomados para a realização de uma simulação bem apurada. O termo de energia de ligação é definido pela equação 11:

$$U_{lig} = \sum_{lig\ i} k_i^{lig} (r_i - r_{0i})^2 \quad .(11)$$

que descreve o potencial de ligação de um átomo  $i$  como a somatória dos potenciais resultantes de todas as ligações covalentes diretas em que tal átomo participa. Por sua vez, cada ligação que tal átomo participa é descrito como sendo uma função exponencial de grau 2 clássica que depende de sua posição  $r_i$ , a posição do átomo ligante  $r_{0i}$  e a constante de ligação  $k_i^{lig}$ . Logo se percebe uma diferença primordial entre o potencial de ligação definido aqui e o potencial real, pois diferente deste, FFs clássicos não são capazes de descrever quebra e formação de ligações. De fato, como é mostrado esquematicamente na Figura 8, quando a distância entre dois átomos ligados tende a 0, a energia potencial aumenta exponencialmente (como é de se esperar) devido a repulsão da nuvem eletrônica dos mesmos. Porém, quando essa distância tende ao infinito, o potencial aumenta exponencialmente, em contraste a um sistema real, onde é de se esperar um platô de potencial ao se aproximar do ponto equivalente à energia de dissociação do par (como descrito pelo potencial de Morse).





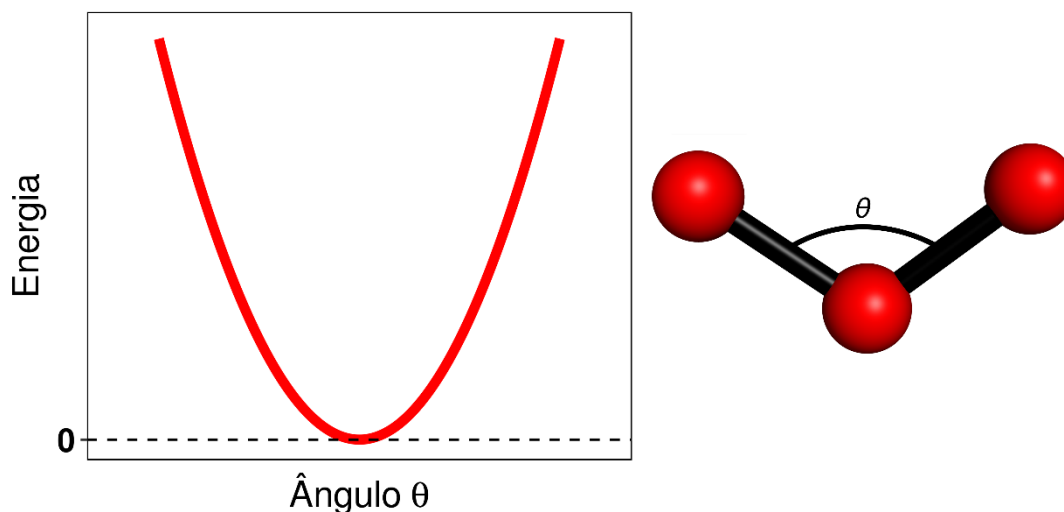
**Figura 8.** Esquema ilustrando o comportamento do potencial de ligação do FF clássico para um par de átomos qualquer em comparação com o potencial de Morse (linha tracejada azul). Modificações na constante de ligação  $k_i^{lig}$  são mostradas para mais (linha preta) e para menos (linha cinza) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar um aumento e diminuição na restrição de estiramento entre dois átomos dependendo do contexto da ligação entre eles (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial de ligação nulo.

Desse modo, a utilização de FFs clássicos é acurada somente em condições onde as energias de ligação entre os átomos do sistema não se aproximam das energias de dissociação, como por exemplo um sistema sob temperaturas muito altas. Uma observação importante está relacionada à parâmetro ligação  $k_i^{lig}$ , a qual permite tornar a função de energia mais “aberta” ou “fechada”, como visto na Figura 8. Isso permite simular ligações mais fortes ou fracas de acordo com a natureza da ligação e/ou dos tipos de átomos envolvidos, ou seja, espera-se que uma ligação dupla seja mais restritiva ao estiramento que uma ligação simples. Tal parâmetro (e os demais parâmetros discutidos a frente) é tabelado para pares de átomos envolvidos nas ligações internas dos componentes dos principais biopolímeros, assim como diversas moléculas importantes no contexto bioquímico.

O segundo termo do potencial total, o potencial angular, é descrito pela equação 12:

$$U_{ang} = \sum_{ang\ i} k_i^{ang} (\theta_i - \theta_{0i})^2 \tag{12}$$

onde o potencial angular que é incidido sobre um átomo  $i$  é dependente do ângulo formado entre este átomo, o átomo ligado diretamente a este e o próximo terceiro átomo ligado (Figura 9). Então, são somados todos os potenciais angulares no qual o átomo analisado está envolvido. Novamente um parâmetro  $k_i^{\text{ang}}$  é adicionado e, de forma análoga ao parâmetro de ligação, é utilizado para descrever ângulos mais ou menos rígidos.

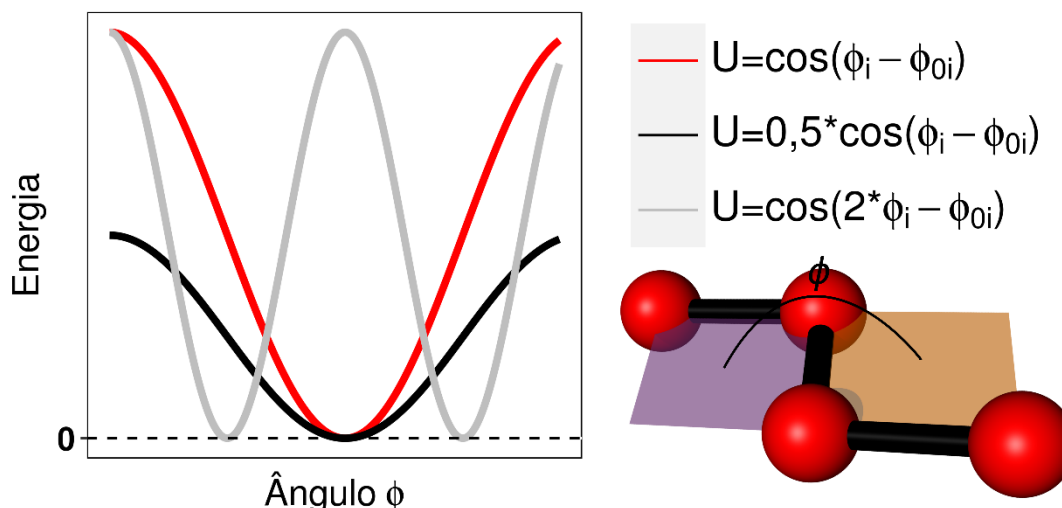


**Figura 9.** Esquema ilustrando o comportamento do potencial angular do FF clássico (linha vermelha) para um trio de átomos quaisquer ligados covalentemente com a formação do ângulo  $\theta$  (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial angular nulo.

O terceiro termo de potencial ligado, conhecido como potencial de diedro próprio é descrito pela equação 13, para um par de átomos separados por três ligações covalentes:

$$U_{died} = \sum_{died\ i} k_i^{died} [1 + \cos(n_i \phi_i - \phi_{0i})] \quad .(13)$$

onde  $\phi_i$  indica o ângulo torcional entre os átomos, mostrado esquematicamente na Figura 10,  $k_i^{died}$  indica a constante torcional para determinado par de átomos e  $n_i$  a constante constricional para os mesmos.

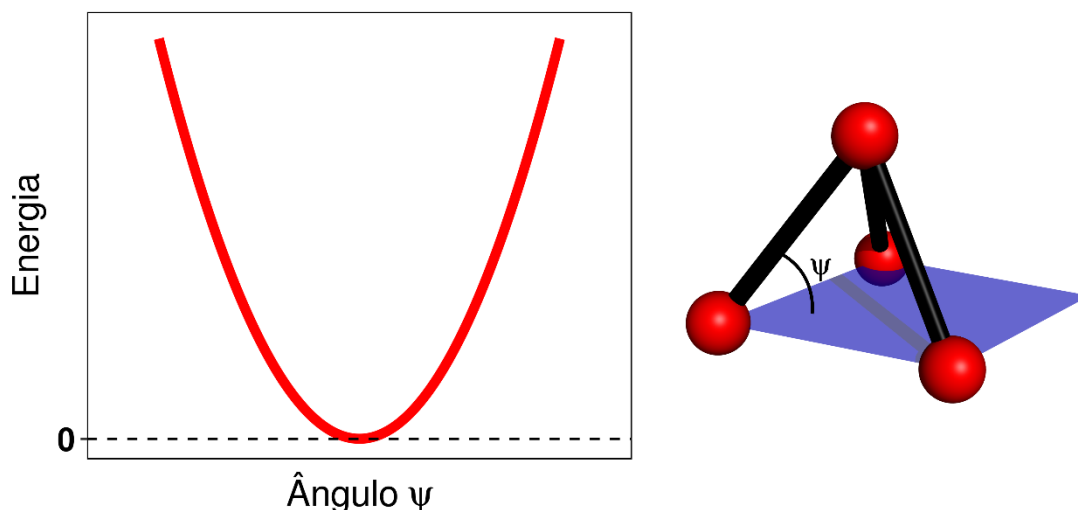


**Figura 10.** Esquema ilustrando o comportamento do potencial de diedro próprio do FF clássico para um par de átomos qualquer separados por três ligações covalentes. Uma modificação na constante diedral  $k_i^{\text{died}}$  é mostrada (linha preta) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar um aumento/diminuição na restrição de rotação do diedro dependendo do contexto da ligação (ver texto para mais detalhes). Uma modificação na constante  $n_i$  é mostrada (linha cinza) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar um aumento/diminuição na frequência do potencial dependendo do número de átomos envolvidos no diedro (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial de diedro próprio nulo. O plano arroxeadado e alaranjado presente na estrutura atômica à direita representa o plano de rotação sobre os quais o ângulo torcional  $\phi$  é calculado.

Aqui vemos a aparição desses dois novos parâmetros importantes para uma descrição mais apurada da variedade de diedros próprios que podem ocorrer em um sistema. Espera-se, por exemplo, que um diedro mediado por uma ligação simples tenha maior liberdade rotacional que uma ligação dupla ou tripla, podendo-se então, corrigir a variação deste potencial com a modificação de  $k_i^{\text{died}}$ . Espera-se também que um diedro mediado por uma ligação simples tenha uma frequência de variação do potencial menor que um diedro ligado a um anel aromático por exemplo. Neste caso, utiliza-se  $n_i$  para a correção da função de potencial.

O quarto e último termo de potencial ligado, conhecido como potencial de diedro impróprio, descreve a geometria planar de quatro átomos ligados covalentemente. Tal potencial é dado também por uma função exponencial de grau 2 dependente do ângulo  $\psi_i$  e um parâmetro de correção  $k_i^{\text{impr}}$  (equação 14), o qual é utilizado para descrever ângulos mais ou menos rígidos, como mostrado esquematicamente na Figura 11.

$$U_{\text{impr}} = \sum_{\text{impr } i} k_i^{\text{impr}} (\psi_i - \psi_{0i})^2 \quad .(14)$$



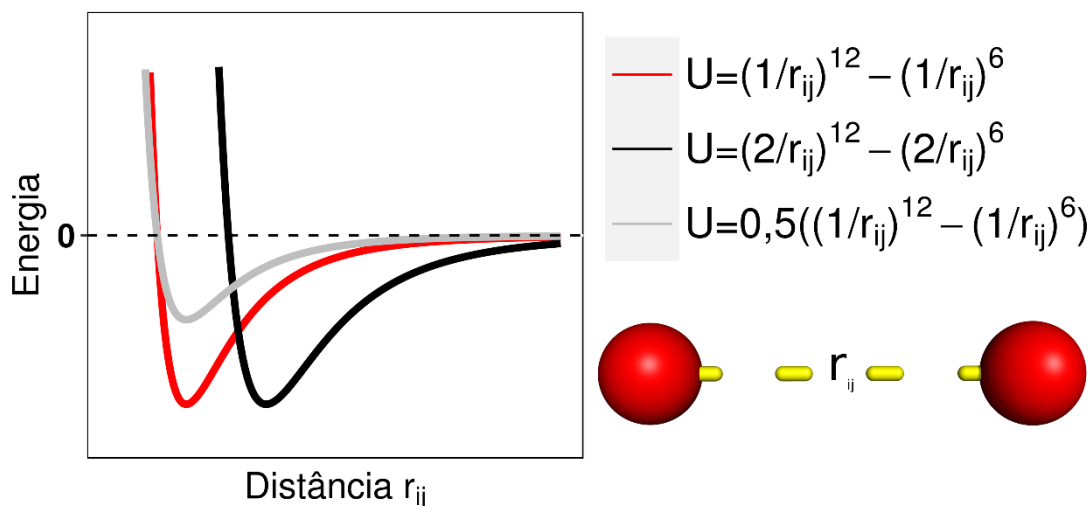
**Figura 11.** Esquema ilustrando o comportamento do potencial de diedro impróprio do FF clássico (linha vermelha) para quatro átomos quaisquer ligados covalentemente com a formação de um plano (plano arroxado na estrutura molecular à direita) sobre o qual é calculado o ângulo  $\psi$  (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial de diedro impróprio nulo.

Dentre os potenciais não-ligados, interações de vdW são dadas por uma aproximação de LJ do tipo 12-6 descrita na equação 15:

$$U_{vdW} = \sum_i \sum_{j>i} 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad .(15)$$

onde  $r_{ij}$  indica a distância entre os dois átomos analisados,  $\sigma_{ij}$  a constante translacional e  $\varepsilon_{ij}$  a profundidade do poço de potencial. A constante translacional é importante pois é utilizada para corrigir a função de energia para pares de átomos com, por exemplo, nuvens eletrônicas maiores ou menores. Analogamente,  $\varepsilon_{ij}$  é utilizado para corrigir a função para interações entre átomos com maior ou menor eletronegatividade. As modificações nestes dois parâmetros são mostradas esquematicamente na Figura 12.

É importante também ressaltar que, devido aos expoentes de alto grau nesta função (12 e 6), interações de vdW são as mais custosas computacionalmente, levando-se a utilização de determinadas aproximações que incidem sobre este potencial objetivando a diminuição do tempo de cálculo. Uma destas aproximações estabelece uma distância de corte (*cutoff distance* no inglês) para átomos distantes a um determinado valor entre si. Pares de átomos com uma distância de separação acima desse valor têm o potencial



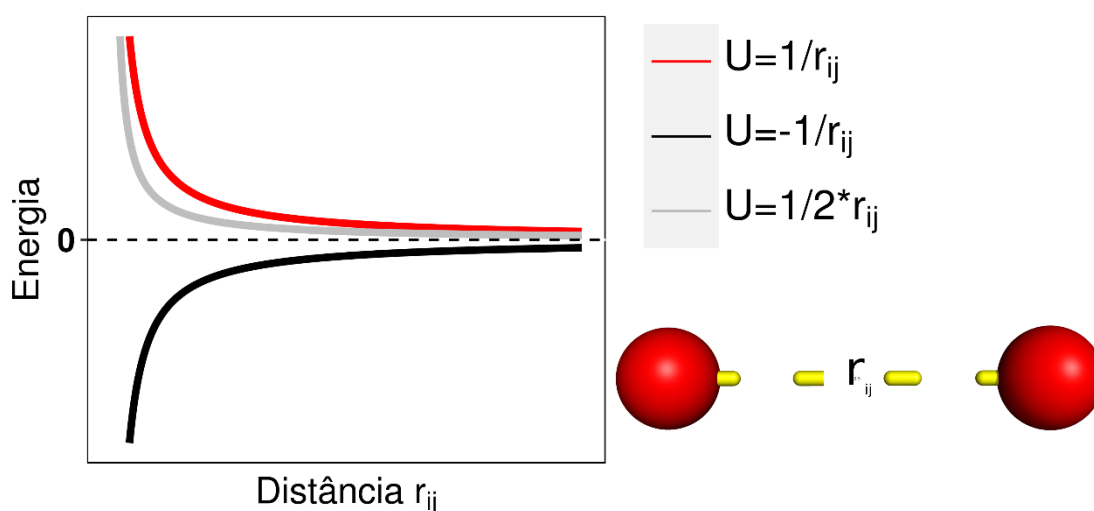
**Figura 12.** Esquema ilustrando o comportamento do potencial de LJ do FF clássico para um par de átomos qualquer não-ligados. Uma modificação na constante  $\sigma_{ij}$  é mostrada (linha preta) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar um deslocamento no potencial de forma a melhor descrever a variedade de possibilidades de pares atômicos possíveis. Uma modificação na constante  $\epsilon_{ij}$  é mostrada (linha cinza) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar um aumento/diminuição no poço de potencial dependendo da eletronegatividade dos átomos envolvidos na interação (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial de LJ nulo. A linha tracejada amarela entre os átomos a direita indica a distância  $r$  entre eles, sobre a qual o potencial de LJ é calculado.

de vdW nulo e a aproximação de LJ não é aplicada para o cálculo dessa interação entre estes dois átomos. Isso é válido uma vez que interações dessa natureza manifestam-se de forma considerável apenas a distâncias menores que 12 Å (Price and Brooks III 2004). Logo, é comum a utilização deste valor para a distância de corte em trabalhos de MD (Woolf and Roux 1996). No entanto, para evitar erros decorrentes de uma descontinuidade na função potencial em 12 Å, uma função de amortecimento (*smoothing function* no inglês), geralmente uma função linear, é utilizada para conectar o potencial de LJ entre uma distância determinada (geralmente 10 Å) e a distância de corte. Outra aproximação utilizada em programas de MD indica quais átomos serão listados como pares do átomo analisado baseado em uma métrica de distância. Tal distância é geralmente fixada em 13.5 Å e indica, resumidamente, que para um átomo  $x$ , apenas átomos a uma distância menor ou igual a essa distância podem interagir com o mesmo. Logo, todos os pares que não se enquadram como tal apresentam interação total (não apenas vdW) nula. Essas aproximações evitam o cálculo de potenciais numericamente desprezíveis e diminuem grandemente o custo computacional para cálculos de MD, levando-se em conta que, para um sistema de tamanho médio, as distâncias da maioria dos pares de átomos não devem enquadrar-se nas restrições apresentadas.

O último dos potenciais a ser descrito é resultado direto da interação de cargas entre um par de átomos e é indicado na equação 16:

$$U_{Coulomb} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad .(16)$$

onde  $q$  indica as cargas dos átomos  $i$  e  $j$  respectivamente,  $r_{ij}$  a distância entre estes e  $\epsilon_0$  a permissividade elétrica do meio. A importância destes parâmetros é mostrada esquematicamente na figura 13. De fato, o produto das cargas dos dois átomos analisados é indispensável para indicar se a natureza da interação será repulsiva ou atrativa. Já a permissividade possibilita a variação de quão potente é a interação entre cargas a uma mesma distância.



**Figura 13.** Esquema ilustrando o comportamento do potencial de Coulomb do FF clássico para um par de átomos qualquer não-ligados. Uma modificação na constante no produto das cargas dos dois átomos é mostrada (linha preta) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar uma mudança na natureza repulsiva ou atrativa da interação dependente dos sinais das cargas desses dois átomos. Uma modificação na constante  $\epsilon_0$  é mostrada (linha cinza) em relação ao potencial original (linha vermelha) para demonstrar uma distorção no potencial dependendo da permissividade elétrica do meio (ver texto para mais detalhes). A linha tracejada preta indica potencial de Coulomb nulo. A linha tracejada amarela entre os átomos a direita indica a distância  $r$  entre eles, sobre a qual o potencial de Coulomb é calculado.

A obtenção dos parâmetros anteriormente citados ( $k_i^{lig}$ ,  $n_i$ ,  $\epsilon_{ij}$ , etc) em cada contexto de ligação e/ou interação (para a maioria das moléculas comumente encontradas em sistemas bioquímicos) pode variar por metodologias empíricas, metodologias

puramente quânticas ou uma mistura de ambas (como o conjunto de parâmetros do NAMD) dependendo do grupo que os obteve (Phillips et al. 2005).

Diante do colocado, o funcionamento de um algoritmo de MD pode ser brevemente resumido em sete passos: (i) caracterização dos parâmetros do FF para todos os átomos do sistema de acordo com o conjunto previamente estabelecido (GROMACS, AMBER, NAMD, etc); (ii) atribuição de velocidades iniciais aleatórias para cada átomo do sistema (respeitando-se a condição termodinâmica de proporcionalidade direta entre velocidade média e o produto da constante de Boltzman e temperatura); (iii) atualização do novo posicionamento de cada átomo após um intervalo fixo de tempo, o qual é geralmente fixado na escala de fs (femtosegundo); (iv) cálculo da energia potencial total incidida sobre cada átomo segundo o FF como o discutido anteriormente (geralmente a etapa mais custosa do processo); (v) cálculo da força total incidida sobre cada átomo; (vi) cálculo da aceleração de cada átomo; (vii) volta-se ao passo iii enquanto o tempo total de simulação requerido pelo pesquisador não for atingido (Phillips et al. 2005).

No entanto, o processo de realização de uma simulação de MD é precedida por uma etapa de preparação do sistema biológico a ser emulado, o qual engloba a amostragem do modelo da proteína a ser estudada (que pode ser obtido em bancos de dados de estruturas cristalográficas, modelada por homologia ou por outros meios), retirada de eventuais artigos de cristalização (caso seja o caso), solvatação da proteína e adição de íons para o ajuste correto da força iônica desejada (Cui, Yang, and Li 2015; Brunne and van Gunsteren 1993). Esse processo sugere a translocação da proteína analisada de seu ambiente original (geralmente um ambiente cristalográfico) para um ambiente totalmente distinto. Diante disso, emerge a necessidade da utilização de processos que visam diminuir os artefatos associados a essa transição que possam afetar a fieza das análises realizadas sobre uma MD. Logo, trabalhos relacionados a essa área geralmente realizam uma série de simulações de MD que não são utilizados para análises conclusivas, mas que resultam, ao final do processo, em coordenadas iniciais do sistema em que se acredita que os efeitos da transição de ambientes sejam desprezíveis (Kuksin et al. 2005). Esse processo é geralmente denominado relaxamento e apenas ao final do mesmo são realizadas MDs sobre as quais serão feitas análises conclusivas (ou MDs produtivas). O processo de relaxamento varia grandemente de trabalho para trabalho e

é intimamente relacionado ao sistema estudado (Kuksin et al. 2005). Ele é habitualmente realizado aplicando-se restrição harmônica (HR, do inglês *harmonic restraint*) para os átomos da proteína e eventuais ligantes, onde os mesmos se veem com mobilidade diminuída. Essa restrição é caracterizada por um potencial harmônico (análogo ao potencial de ligação, de ângulo e de diedro impróprio do FF), onde o fundo do poço de potencial refere-se à posição inicial de determinado átomo (Shen et al. 2015). Desta maneira, a tentativa do átomo de afastar-se em demasia é frustrada por forças que tentam aproximá-la de seu ponto inicial. Os processos de relaxamento então, caracterizam-se pela diminuição gradual e planejada do número de átomos harmonicamente restritos, pelo decrescimento e suavização desse potencial de restrição ou ainda por uma mistura dos dois (suavização da restrição conjuntamente à diminuição do número de átomos restritos). Ao final são geradas as coordenadas iniciais para as MDs produtivas.

Após a realização das MDs produtivas, são finalmente geradas trajetórias críveis sobre as quais análises visuais do movimento das estruturas do sistema (análises estruturais) e análises de grandezas numéricas relacionadas aos sistemas estudados podem ser realizados. Existem uma infinidade de observações que podem ser feitas com uma trajetória de MD em mãos e muitas delas visam explicar o sistema em termos de físico-química. Logo, análises de energia e a observação dos termos entálpicos associados ao sistema ao longo da simulação são tão importantes quanto facilmente acessadas computacionalmente (levando-se em conta que o algoritmo o fez repetidas vezes durante o processo de geração da MD). No entanto, os termos entrópicos, igualmente importantes para a estabilidade de um sistema termodinâmico, não são tão acurados, corriqueiramente calculados e robustos quanto análises de entalpia.

## 1.8 Metodologias de Estimativa de Entropia

Atualmente, as metodologias de estimativa de entropia a partir de trajetórias resultantes de MD não apresentam grande reprodutibilidade com análises de bancada em termos numéricos, mas mostram-se repetidamente capazes de serem experimentos para comparação entre dois sistemas modelados computacionalmente (Genheden and



Ryde 2015; Goethe, Fita, and Rubi 2015; Numata, Wan, and Knapp 2007; Levy et al. 1984). Felizmente, existe um número crescente dessas metodologias, com seus pontos fortes e fracos, mas aqui adentramos apenas as metodologias utilizadas neste trabalho: a metodologia de entropia quasi-harmônica e a metodologia de colônia adaptada por Martínez e Nascimento (Karplus and Kushick 1981; L. Martínez et al. 2009).

### 1.8.1 A aproximação quasi-harmônica

A aproximação quasi-harmônica, relatada por Karplus e Kushick em 1981 e otimizada por Andricioaei e Karplus em 2001, é utilizada para estimar-se a entropia conformacional para várias técnicas de simulação molecular, incluindo a MD. Para isso, é calculada a covariância de movimento de cada par de átomos da molécula analisada ao longo da trajetória de MD. Tal indicador resulta em um número que pode variar entre números negativos e positivos, onde um sinal positivo para a covariância sugere reciprocidade de movimento entre o par, ou seja, a movimentação de um dos átomos induz a movimentação de seu par na mesma direção. No outro extremo, uma covariância de negativa indica movimentos com direções opostas, enquanto que em 0, não existe qualquer correlação de movimento. Para os casos de covariância negativa e positiva, a intensidade da correlação de movimento é dada pelo módulo da covariância. Após o cálculo da correlação ponderada pela massa para todos os pares de átomos, uma matriz  $\sigma$  é gerada contendo a correlação de todos os pares possíveis. De posse dessa matriz (obtida e calculada sobre a trajetória de MD), é possível diagonalizá-la e obter seus autovalores  $\lambda_i$  para cada modo normal de vibração  $i$  (define-se modos normais de vibração de uma molécula como todos os movimentos unitários que, em conjunto, geram o movimento aleatório da mesma, excetuando-se os movimentos de translação e rotação. O número máximo de modos normais vibracionais de um sistema é dado por três vezes o número de átomos presentes menos seis). Assumindo-se que as frequências vibracionais  $\omega_i$  de cada modo normal da molécula, a uma determinada temperatura  $T$ , podem ser obtidas segundo a equação 17, e assumindo-se aproximação quasi-harmônica para os movimentos observados no sistema (ou seja, as flutuações observadas durante os movimentos do sistema obedecem uma distribuição quasi-Gaussiana de probabilidade; Andricioaei and Karplus 2001), diversas grandezas

termodinâmicas podem ser geradas a partir das frequências de vibração de cada modo normal da molécula.

$$\omega_i = \sqrt{\left(\frac{kT}{\lambda_i}\right)}$$

.(17)

Dentre elas, destaca-se a entropia quasi-harmônica  $S_{ho}$ :

$$S_{ho} = k \sum_i^{3N-6} \frac{\hbar\omega_i/kT}{e^{\hbar\omega_i/kT} - 1} - \ln(1 - e^{-\hbar\omega_i/kT})$$

.(18)

oriunda da função de partição vibracional do oscilador harmônico para um número de átomos  $N$ . Essa função assume que a entropia de um sistema pode ser obtida pela partição dos pesos energéticos associados à vibração de cada modo normal  $i$  presente no sistema. Quando calculada  $S_{ho}$  para dois estados de uma molécula (por exemplo os estados livre e ligado de um inibidor), é possível obter a variação de entropia  $\Delta S$  para tal transformação do sistema. Interessantemente, a variação de entropia pode ser desmembrada na soma das contribuições da variação de entropia rotacional ( $\Delta S_{rot}$ ), translacional ( $\Delta S_{trans}$ ) e vibracional ( $\Delta S_{vib}$ ):

$$\Delta S = \Delta S_{rot} + \Delta S_{trans} + \Delta S_{vib}$$

.(19)

espera-se, no entanto, que as variações de entropias rotacionais e translacionais sejam muito próximas quando comparadas duas moléculas configuracionalmente próximas (como os ligantes galantamínicos aqui estudados), podendo ambos os termos ser dispensados neste caso. A entropia vibracional, por outro lado, pode variar significativamente mesmo com sutis diferenças entre duas moléculas (Karplus and Kushick 1981). Este termo pode também ser obtido por aproximação quasi-harmônica

para dois estados a e b de uma molécula segundo a equação 20 (Karplus and Kushick 1981).

$$\Delta S_{vib} = k_b \ln \left[ \frac{\prod_{i=1}^{3N-6} \omega_i(a)}{\prod_{i=1}^{3N-6} \omega_i(b)} \right] \quad .(20)$$

Outra grandeza que pode ser obtida pela aproximação quasi-harmônica dos movimentos é a energia vibracional, a qual demonstra-se especialmente útil para a verificação da alocação da energia cinética em modos de vibração quando inibidores ligam-se no sítio-ativo de proteínas (Chang, Chen, and Gilson 2007; ver tópico 3.4), energia essa a qual pode ser estimada pelas frequências vibracionais segundo a equação 21 (Andricioaei and Karplus 2001):

$$E = \sum_i^{3N-6} \frac{\hbar\omega_i}{2} + \frac{\hbar\omega_i}{e^{\hbar\omega_i/kT} - 1} \quad .(21)$$

É possível ainda obter a capacidade calorífica  $C_v$  do sistema (equação 22) pela aproximação quasi-harmônica, mostrando a pluralidade de grandezas oriundas dessa metodologia.

$$S_{ho} = \sum_i^{3N-6} k \left( \frac{\hbar\omega_i}{kT} \right)^2 \frac{e^{\hbar\omega_i/kT}}{(e^{\hbar\omega_i/kT} - 1)^2} \quad .(22)$$

As entropias e energias resultantes mostram-se vantajosas para a comparação dos termos conformacionais entre dois sistemas parecidos, mas podem apresentar limitações ao desconsiderar outros termos que contribuem para a entropia total.

### 1.8.2 A aproximação do espaço de fases

Surge então, de modo complementar, a metodologia de colônia adaptada por Martínez e Nascimento em 2009 para a utilização em simulações de MD. Tal técnica consiste na

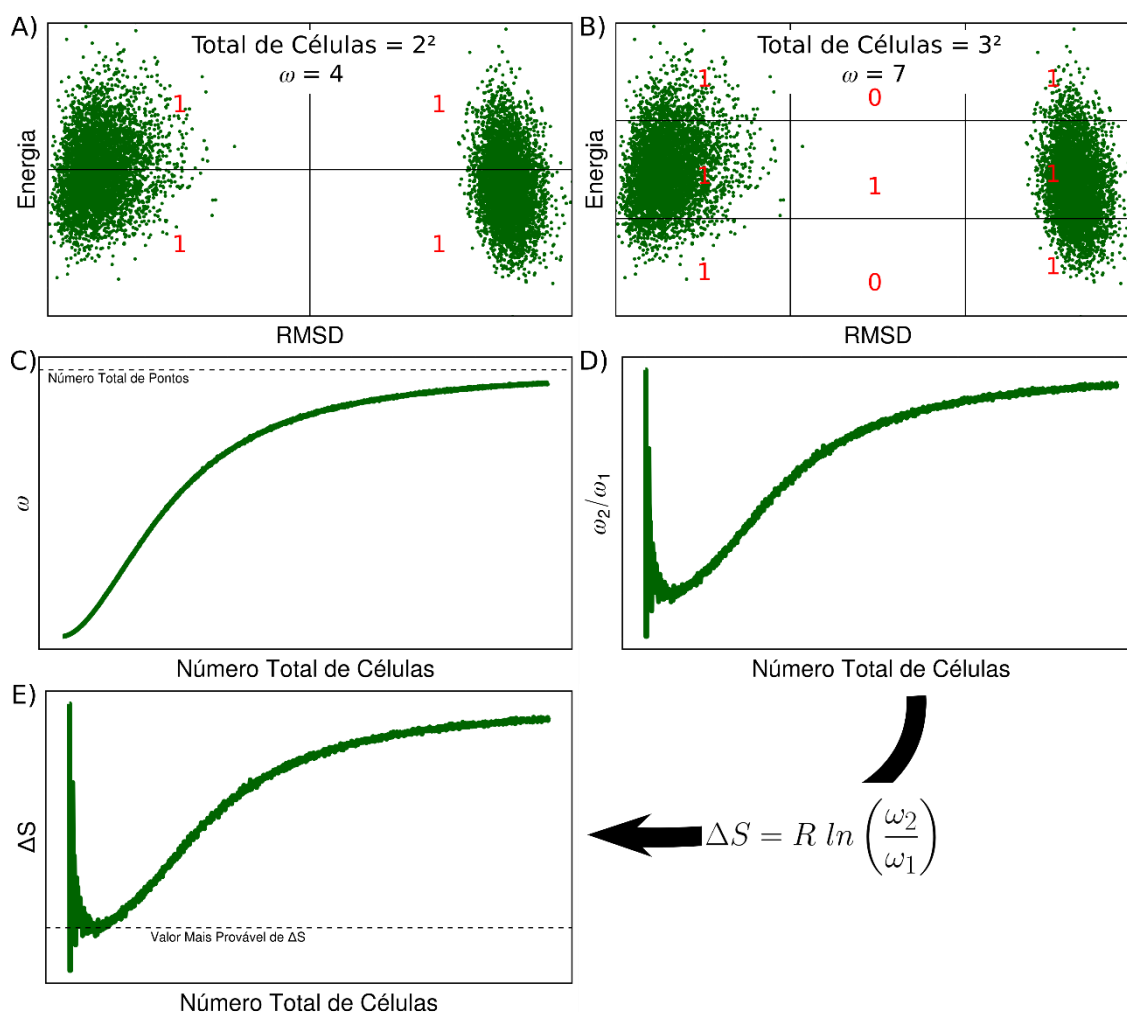
aproximação do espaço de fases, um espaço hexadimensional de momentum *versus* posição nos três eixos cartesianos, para um espaço bidimensional de energia e RMSD relativo a uma pose de referência. Ambos os últimos são facilmente obtidos em análises de MD e resultam em um espaço como exemplificada na Figura 14-A. Tal espaço é então submetido a subdivisão equipartida em  $2^2$  células, onde cada subdivisão é avaliada quanto à existência ou não de ao menos um ponto em seu interior. As células com resposta positiva a essa avaliação recebem o número 1, caso contrário, recebem 0. A quantidade de células totais e a quantidade de células ocupadas é então armazenada e o espaço original é novamente subdividido em  $3^2$  células e uma nova avaliação é realizada (Figura 14-B). Tal processo é repetido  $n$  vezes até um total de  $n^2$  células totais, gerando um gráfico de células totais versus células ocupadas  $\omega$  (Figura 14-C).

Tal algoritmo é processado para dois estados de um sistema (para um ligante, por exemplo, seu estado livre e ligado), resultando em dois gráficos de ocupância, os quais são divididos resultando no gráfico da Figura 14-D. Para cada ponto deste gráfico é então aplicada a fórmula clássica de entropia variada da mecânica estatística:

$$\Delta S = R \ln \left( \frac{\omega_2}{\omega_1} \right) \quad .(23)$$

onde a variação de entropia  $\Delta S$  é equivalente a constante de Boltzman  $R$  e o logaritmo neperiano do quociente entre  $\omega_2$  (soma das células ocupadas no estado 2) e  $\omega_1$  (soma das células ocupadas no estado 1). A aplicação dessa fórmula para cada total de células resulta num gráfico análogo ao presente na Figura 14-E. Tal gráfico pode emergir no eixo positivo ou negativo das ordenadas dependendo da favorabilidade entrópica ou não da transição do estado 1 para o 2. Nota-se também que para o limite em 1 a entropia tende a 0, o que é esperado pois os dois sistemas, em uma subdivisão  $1^2 = 1$ , apresentam ambos ocupância  $\omega_1 = \omega_2 = 1$  e resultando em  $\ln(\omega_1/\omega_2) = 0$ . No limite em  $+\infty$  observa-se também uma tendência em direção a 0, o que é esperado quando  $\omega_1$  e  $\omega_2$  aproximam-se do número total de pontos, o qual deve ser igual para ambos os estados. No entanto, entre esses dois limites é observável um poço (ou pico) onde o valor de  $\Delta S$  é o mais provável, permitindo-se comparar moléculas parecidas quanto a este valor.

Apesar ser um método que permite levar em conta indiretamente os efeitos de solvatação pela utilização da energia como entrada, a brusca aproximação do espaço de fases sugere uma pobre consideração dos termos conformacionais. Diante disto, a utilização das duas metodologias de cálculo de entropia citadas apresenta-se como complementares para um melhor entendimento dos fatores termodinâmicos que envolvem a afinidade de galantamínicos nos sítio-ativo da AchE.

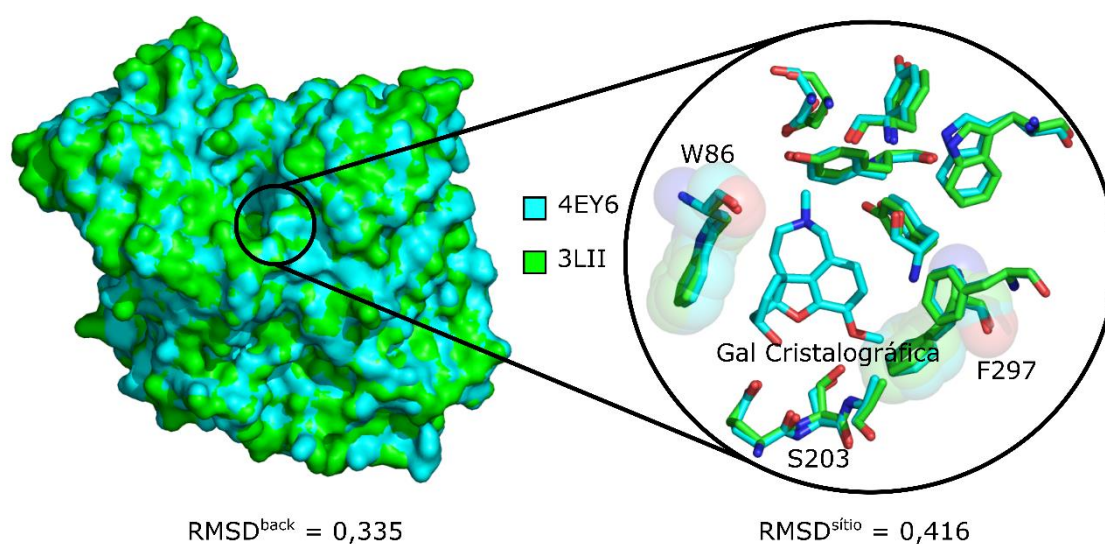


**Figura 14.** Esquematisação do processo de obtenção da variação de entropia estimada pelo método de colônia adaptada por Martínez e Nascimento, 2009 para um sistema modelo; A) subdivisão do universo amostral em 4 células, universo esse obtido através de análises de energias totais e respectivos RMSDs ao longo da trajetória de MD. Note que todas as células estão ocupadas, totalizando um  $\omega = 4$ ; B) subdivisão do universo amostral em 9 células, onde nem todas as células estão ocupadas por ao menos um ponto, totalizando um  $\omega = 7$ ; C) exemplo de gráfico obtido após a subdivisão infinitesimal do universo amostral e suas respectivas ocupâncias  $\omega$ ; D) exemplo de gráfico obtido após a divisão das ocupâncias  $\omega$  para dois estados de um mesmo sistema (por exemplo, o estado livre e o estado complexado de um ligante); E) exemplo de gráfico obtido pela aplicação da fórmula clássica de variação de entropia para cada  $\omega_2/\omega_1$  obtido no gráfico anterior. Note o surgimento de um poço que sinaliza o valor mais provável da variação de entropia (linha tracejada; ver texto para mais detalhes).

## 2 Metodologia

### 2.1 Amostragem das Estruturas Cristalográficas

Foram selecionadas duas conformações cristalográficas de hAChE no PDB (Figura 15; Berman et al. 2002). O cristal de código 3LII (aqui referido como estrutura *apo*) é a forma *apo* da proteína resolvida com 3.2 Å de resolução (Dvir et al. 2010). O estrutura de código 4EY6 (aqui referida como estrutura *holo*) compreende o cristal de hAChE originalmente complexado com Gal resolvida com 2.4 Å de resolução (Cheung et al. 2012). Não foram encontradas estruturas cristalográficas para AchE complexadas com Sng, Lyc ou Hyb. Ambas as conformações amostradas mostraram um RMSD entre seus respectivos *backbones* de 0,335 Å e um RMSD entre seus respectivos sítios-ativos (apenas átomos pesados) de 0,416 Å. Ambas as estruturas foram selecionadas com o objetivo de aumentar a amostragem conformacional inicial para as análises de dinâmica molecular. Vistos os baixos valores de RMSD entre essas duas conformações, inferiu-se que ambas as estruturas poderiam ser adotadas como subconjuntos de um mesmo espaço de fases a fim de, posteriormente, analisar as duas simulações como um mesmo espaço de amostral para efeitos estatísticos (ver tópico 3). As estruturas de Gal, Sng e Lyc foram coletadas do ZINC Database (J. J. Irwin and Shoichet 2005). A estrutura de Hyb



**Figura 15.** Análise estrutural comparando as duas conformações AP inicial de hAChE usadas neste estudo. Os respectivos valores de desvio quadrático médio baixo (RMSD) mostram nenhuma distinção substancial considerando tanto o backbone da proteína principal (esquerda) como as topologias de átomos pesados do site ativo (direita). Os aminoácidos que mostram interações significativas para todos os ligantes e mais discutidos ao longo do texto têm suas respectivas superfícies de Van der Waals descritas em transparentes.

foi desenhada usando Avogadro 1.1.1 (Hanwell et al. 2012), e sua geometria foi otimizada usando minimização de gradiente conjugado no mesmo *software* sob campo de força UFF (*Universal Force Field*).

## 2.2 Modelagem de GAPS, determinação do estado de protonação e parametrização dos ligantes

As lacunas encontradas nas estruturas das proteínas foram modeladas usando o *software* Modeller versão 9 (Sali and Blundell 1993). As posições dos resíduos faltantes foram determinadas por homologia utilizando como modelos as estruturas com sequências mais semelhantes armazenadas no banco de dados do *software* (ou seja, usando o protocolo padrão do programa). Os estados de protonação foram determinados utilizando o servidor H ++ (Anandkrishnan, Aguilar, and Onufriev 2012; Myers et al. 2006; Gordon et al. 2005), assumindo condições fisiológicas de salinidade (0,15 M), pH 7,0 e permissividades dielétricas relativas internas e externas de 10 e 80 respectivamente. O estado de protonação de cada histidina dos modelos retornados foram verificados manualmente. As cargas dos átomos dos ligantes foram calculadas usando o método AM1-BCC e os parâmetros destes foram gerados usando o campo de força geral do Amber (GAFF, do inglês *General Amber Force Field*) utilizando o módulo ANTECHAMBER do AMBERTools 12 (J. Wang et al. 2004, 2006).

## 2.3 Atracamento molecular, solvatação e ionização

As análises de ancoragem em triplicata foram realizadas para cada ligante em cada conformação proteica, totalizando 24 análises de atracamento (seis por inibidor). Para esses ensaios, utilizou-se o *plugin* AutodockVina presente no *software* de visualização Pymol (Trott and Olson 2010). Foi utilizada uma caixa de atracamento que abrangeu toda a cavidade catalítica tratando-se os resíduos W86, Y124, S203, Y337 e H447 como flexíveis. Todos os demais parâmetros de atracamento foram configurados e definidos de acordo com padrão do *software*. Para a melhor pose de ancoragem retornada pelas análises de atracamento de cada ligante em cada conformação da proteína foi calculado

o RMSD dos átomos pesados contra a estrutura cristalográfica da Gal. Para cada ligante, também foi calculado o desvio padrão e a média da pontuação energética das 5 melhores poses de encaixe de todas as três repetições nas estruturas *apo* e *holo* (totalizando 30 poses para cada respectivo inibidor), sendo a significância estatística das diferenças entre os escores energéticos médios finais de cada respectivo ligante diferenciados via análise de variância (ANOVA). A melhor pose para cada sistema foi, finalmente, amostrada e solvatada com água no modelo TIP3P em uma caixa cúbica de 12 Å a partir dos átomos mais extremos da proteína usando o *plugin* Solvate v1.5 para VMD (Humphrey, Dalke, and Schulten 1996). A força iônica foi ajustada para 0.15M de NaCl após neutralização usando o *plugin* Autoionize v1.3 para VMD. Os sistemas finais, incluindo moléculas de água e contra-íons, resultaram em aproximadamente 69.000 átomos. A preparação de sistemas de ligantes livres foi realizada seguindo a mesma metodologia, totalizando aproximadamente 6.500 átomos.

## 2.4 Simulações de Dinâmica Molecular

Após a solvatação e ionização da melhor pose de atracamento para cada sistema, as MDs foram performadas sob campo de força AMBER 99 utilizando o *software* NAMD 2.10 (Phillips et al. 2005), com um passo de integração de 2 fs. A transformação termodinâmica foi realizada sob condições NPT (número de partículas, temperatura e pressão constantes) com a temperatura e pressão sendo controladas segundo algoritmo de Langevin em 300 K e 1 atm respectivamente. Foram utilizadas condições periódicas de contorno e corte de interações eletrostáticas 12 Å para as interações não-ligadas. As interações eletrostáticas de longo alcance foram calculadas por Particle Mesh Ewald (PME). O protocolo de relaxamento em condição NPT foi aplicado para todos os sistemas. Este protocolo consistiu de:

- 500 passos de minimização por gradiente de conjugado;
- 200 ps de MD, com HR para todos os átomos da proteína e ligante;
- 200 ps de MD, com HR para todos os átomos da proteína;
- 300 ps de MD, com HR para todos os átomos da proteína, exceto para as cadeias laterais dos resíduos próximos a 5 Å do ligante;



- 300 ps de MD, com HR para todos os átomos da proteína, exceto para as cadeias laterais dos resíduos próximos a 10 Å do ligante;
- 300 ps de MD, com HR para todos os átomos da proteína, exceto para as os resíduos próximos a 10 Å do ligante (incluindo o *backbone*);
- 300 ps de MD, com HR apenas para o backbone dos resíduos a uma distância maior que 10 Å do ligante;
- 4000 ps de MD de pré-produção sem restrições.

As velocidades foram reiniciadas e simulações produtivas de 20 ns sobre as coordenadas finais do relaxamento foram realizadas também sobre condições NPT. As análises foram realizadas para cada ligante nos confôrmeros *holo* e *apo*, totalizando 40 ns de simulação produtiva para cada ligante.

Adicionalmente, simulações dos ligantes livres foram realizadas com as condições bioquímicas, campo de força, parâmetros de integração mantidos iguais. O protocolo de relaxamento para ligantes livres consistiu em:

- 500 passos de minimização por gradiente conjugado;
- 200 ps de MD, com HR apenas para todos os átomos do ligante
- 1000 ps de MD de pré-produção sem restrições.

As velocidades foram reiniciadas e 20 ns de simulação produtiva foram realizadas para cada ligante. Essa metodologia foi aplicada duas vezes por cada inibidor, totalizando 40 ns de simulação produtiva para cada ligante livre (aqui denominada trajetória livre).

## 2.5 Análises Pós-Produção das Trajetórias de MD

Análises de RMSD relativo ao primeiro quadro contra o *backbone* proteico ao longo de toda a trajetória foram realizadas para cada sistema simulado utilizando-se o *plugin* para o VMD, RMSD Trajectory Tool. Para o caso das simulações com os ligantes livres, o RMSD foi realizado contra os átomos do cerne galantamínico (átomos comuns a todos os ligantes), também relativo ao primeiro quadro de cada respectiva trajetória livre.

Análises de clusterização das trajetórias resultantes da MD, tanto para os ligantes complexados quanto livres, foram realizadas utilizando-se o *software* GMX presente no

conjunto de ferramentas do GROMACS contra as coordenadas internas dos átomos pesados (não-hidrogenóides; Berendsen, van der Spoel, and van Drunen 1995). Foi utilizado o Método de *single linkage* e um RMSD de 0,12 Å para os ligantes complexados e 0,16 Å para os ligantes livres.

Cinco frames aleatórios de cada cluster significativamente populoso resultante de MD de cada sistema foram amostradas para análises de energia interna dos ligantes no vácuo. Para isso, as coordenadas dos ligantes em cada amostra foram separadas do restante do sistema. Os átomos que envolvem o anel não-aromático do núcleo galantamínico (C4, C5, C6, C7 C8 e C9) de cada ligante foram fixados e a minimização de energia sob GAFF e algoritmo de *steepest descent* foi realizada utilizando o *software* Avogadro 1.1.1 (Hanwell et al. 2012). As respectivas médias e desvios foram plotadas.

Análises de energia total para todos os ligantes em todas as simulações de MD foram realizadas no *plugin* NAMDenergy para VMD (Humphrey, Dalke, and Schulten 1996).

## 2.6 Estimativas de Entropia de Ligação

Para um vislumbre da variação da entropia de ligação, as trajetórias internas totais de cada ligante (isto é, trajetórias oriundas do alinhamento do cerne galantamínico de cada respectivo ligante, de modo a descartar os movimentos de translação e rotação) nos respectivos estados livres e ligados foram sujeitas a duas técnicas computacionais distintas de estimativa de entropia conformacional/configuracional: entropia quasi-harmônica e método de colônia adaptado de Martinez-Nascimento (Karplus and Kushick 1981; L. Martínez et al. 2009), ambas conceitualmente detalhadas no tópico 1.8.

Para a estimativa de entropia quasi-harmônica, trajetórias de coordenadas internas (análoga às trajetórias utilizadas para as análises de clusterização interna) de cada ligante no estado livre e ligado foram submetidas ao *software* wordom 0.22 (Seeber et al. 2007). O mesmo realizou o cálculo e diagonalização da matriz de covariância ponderada por massa atômica dos átomos pesados do ligante, sendo as entropias finalmente estimadas pelos respectivos autovalores, resultando na entropia vibracional de cada sistema. Por este mesmo método, também obteve-se a porção vibracional das

energias internas dos ligantes nos respectivos estados livres e ligados. A variação de ambos os termos (energia vibracional e entropia vibracional) foi então obtida pela simples subtração dos resultados numéricos obtidos para os sistemas livres para os sistemas ligados, para cada respectivo ligante.

O método de colônia adaptado, por outro lado, foi performado utilizando-se *in-house scripts* que, de forma semelhante ao estudo original de Martínez et al., realiza a contagem de microestados ocupados por cada ligante no espaço bidimensional formado por RMSD *versus* energia, ambos obtidos das trajetórias de MD. É importante observar que as fronteiras desse espaço utilizado para a análise de entropia para cada ligante em separado, correspondem aos mínimos e máximos globais para as análises de RMSD e energia dentre todas as trajetórias analisadas, independentemente do ligante ou tipo de trajetória (livre ou ligada). Diante dessas fronteiras, o algoritmo subdivide recursivamente o espaço 2D de cada respectivo ligante em cada respectiva trajetória livre e ligada em um número de células geometricamente progressivo e associa "1" a cada célula ocupada por ao menos um ponto. O número de células é então somado e o valor resultante é vinculado ao número total de células. Para cada valor de número de células ocupadas é então aplicada a fórmula clássica de entropia descrita na equação 17, resultando em um gráfico de entropia *versus* número total de células. Finalmente, a variação de entropia é obtida diminuindo cada respectivo valor de entropia da trajetória livre para a ligada. O valor mais provável da variação de entropia para cada ligante é então estimado pela observação do poço (ou pico) formado pela plotagem da tabela de variação de entropia *versus* número total de células, o qual indica que próximo a tal subdivisão do espaço 2D existe um  $\Delta S$  suficientemente preciso (para detalhes mais técnicos e teóricos, veja o estudo de Martínez et al. e tópico 1.8)

## 2.7 Dados Visuais, Análises Estruturais e Estatísticas

Todas as estruturas moleculares em bastão mostradas no presente trabalho foram desenhadas utilizando-se o *software* GChemPaint versão 0.14. Imagens tridimensionais de proteínas e pequenas moléculas foram plotadas utilizando o *software* pymol V1.6 (Delano 2002). Análises de estruturas tridimensionais rígidas foram realizadas utilizando

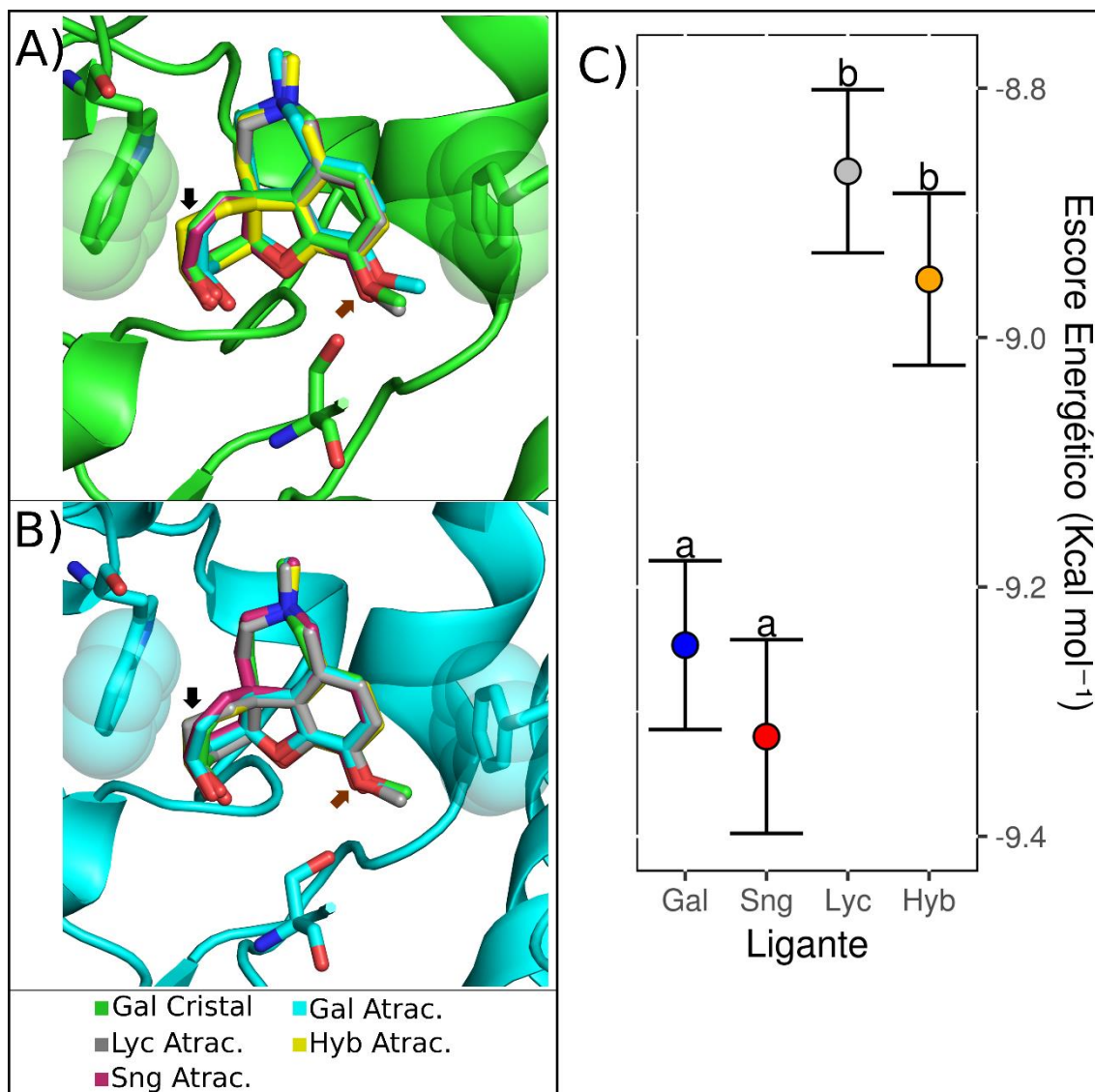
o mesmo *software*. Imagens de padrões de contatos foram obtidas utilizando-se o *software* LigPlot versão 4.5.3 (Wallace, Laskowski, and Thornton 1995). Análises estruturais das trajetórias de MD foram realizadas utilizando o *software* VMD 1.9.2 (Humphrey, Dalke, and Schulten 1996). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando linguagem R versão 3.2.4 e todos os plots de gráficos foram feitos utilizando o pacote GGLOT2 versão 2.2.1 para essa mesma linguagem (R Development Core Team 2008; Wickham 2009). Todos os programas citados na metodologia do presente trabalho foram executados sobre sistema operacional Linux Ubuntu versões 14 ou 16.

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Análises de Atracamento Molecular

As posições mais favoráveis retornadas pelo atracamento demonstram reprodutibilidade para todos os ligantes com desvio mínimo e parecem intimamente análogas à pose experimental da Gal (Figura 16-A e B). Tal padrão de ligação sugere que os mesmos resíduos são os mediadores da ligação para todos os ligantes. Entre estes, destacam-se o resíduo W86 (no local de ligação aniônico), S203 (na tríade catalítica) e F297 (no bolso acílico). De fato, esses resíduos são constantemente apontados na literatura como farmacóforos chave para um conjunto de inibidores de hAChE e para galantamínicos em especial (Cortes et al. 2015; Greenblatt et al. 1999; Correa-Basurto et al. 2014). O primeiro mostra-se essencial para interações de empilhamento com o anel não-aromático dos ligantes. O resíduo S203 é um bom candidato para estabelecer HBs com o grupo oxigenado no anel aromático. Interações hidrofóbicas surgem entre o grupo metoxi presente nos ligantes hidroxil não-modificados (Gal e Lyc) e o resíduo F297. No entanto, o determinante mais significativo para as energias de ligação destes quatro ligantes retornadas pelas análises de atracamento parece residir no local da substituição  $sp^2-sp^3$  entre os carbonos C5 e C6. Um teste de análise de variância (ANOVA), realizado sobre as energias de atracamento das cinco melhores poses de cada ligante para cada uma das duas estruturas alvo (3LII e 4EY6), consegue discretizar e separar apenas os galantamínicos cuja diferença encontra-se na substituição  $C5-C6^{sp^2-sp^3}$ . Em outras palavras, Gal e Sng apresentam energias de atracamento estatisticamente diferentes de Hyb e Lyc, mas esses dois grupos não apresentam diferenças internamente (Figura 16-C). Como veremos a frente, as principais diferenças entre Gal e Sng e, analogamente, entre Lyc e Hyb residem em efeitos de cooperação interna e dessolvatação que não são descritos pelo algoritmo de atracamento, impedindo todos os ligantes sejam ranqueados corretamente. Além disso, os ligantes  $C5-C6^{sp^2}$  (Gal e Sng) apresentam um ranqueamento energético mais favorável que os ligantes  $C5-C6^{sp^3}$  (Lyc e Hyb) em consonância com o esperado pelas afinidades experimentais (López et al. 2002; R. L. Irwin and Smith 3rd 1960). De fato, análises posteriores sugerem que o principal fator de diferenciação de Gal e Sng para Lyc e Hyb aflora de termos entrópicos, os quais são descritos, mesmo que aproximadamente, pela função de avaliação do *software* de

atracamento utilizado (ver tópico 1.6). De fato, na Figura 16-A e B, pode-se notar como um efeito estrutural sutil e significativo da substituição C5-C6<sup>sp2-sp3</sup> (uma mudança de geometria da ligação C5-C6 de planar para tetraédrica) promove uma pequena projeção do grupo C6 na direção da cadeia lateral do resíduo W86 (setas pretas). Nos próximos tópicos, será mostrado que esta pequena modificação é acompanhada por mudanças

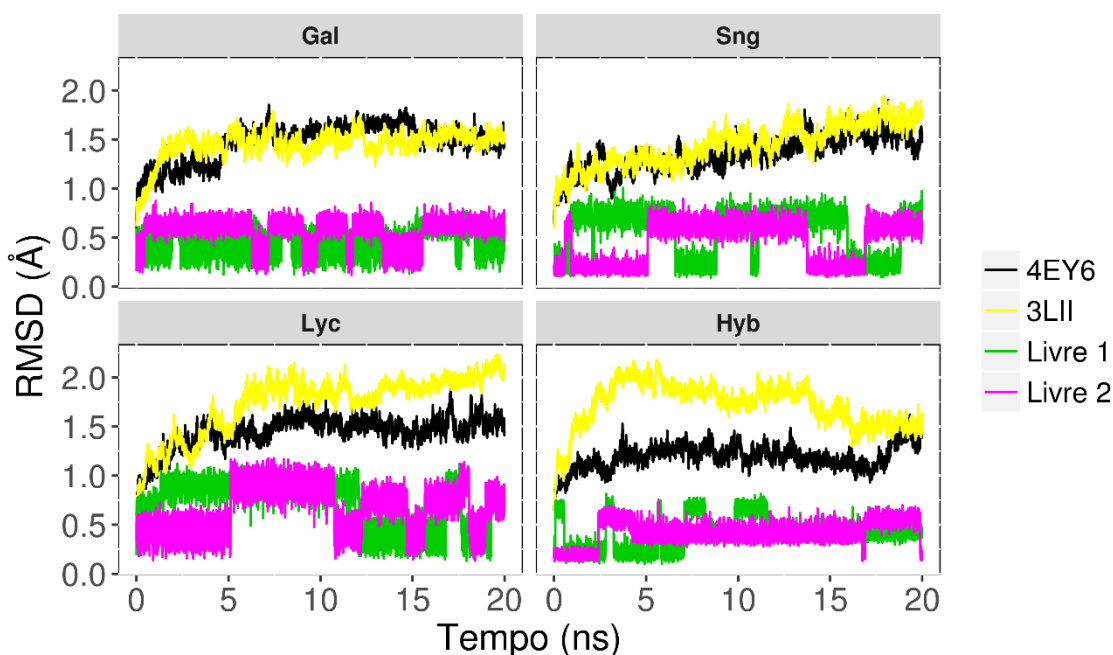


**Figura 16.** Posições mais favoráveis retornadas por análises de atracamento para cada ligante em 4EY6 (A) e 3LII (B) mostram reprodutibilidade quando comparadas ao posicionamento cristalográfico de Gal e os mesmos resíduos que os mediadores da afinidade para todos os ligantes aqui estudados. Em cada imagem, a flecha preta aponta para a "ponta" que surge com a angularidade tetraédrica da ligação C5-C6 com a substituição C5-C6<sup>sp2-sp3</sup> e que se projeta na direção da cadeia lateral W86 (mostrada em bastões e em esferas van der Waals transparentes), enquanto a flecha marrom aponta para a localização da modificação metoxi-hidroxi. Os resíduos S203 (bastões) e F297 (bastões e esferas de van der Waals), que interagem com estes ligantes também são destacados. A análise dos escores de atracamento para as cinco melhores poses de cada replicata para cada ligante (C) separa estatisticamente os ligantes C5-C6<sup>sp2</sup> (Gal e Sng) dos ligantes C5-C6<sup>sp3</sup> (Lyc e Hyb). As letras acima das linhas de desvio mostram grupos com base no teste ANOVA (veja o texto para detalhes e discussões).

significativas no modo de ligação, além de penalidades drásticas para a mobilidade, entropia, desidratação e termos energéticos para os ligantes C5-C6<sup>sp3</sup>.

### 3.2 Análises de RMSD e Agrupamento das Trajetórias de MD

As análises de RMSD contra o primeiro *frame* da trajetória de cada respectivo sistema sugere uma tendência de equilíbrio para todos eles, demonstrando uma boa amostragem para as análises subsequentes (Figura 17).

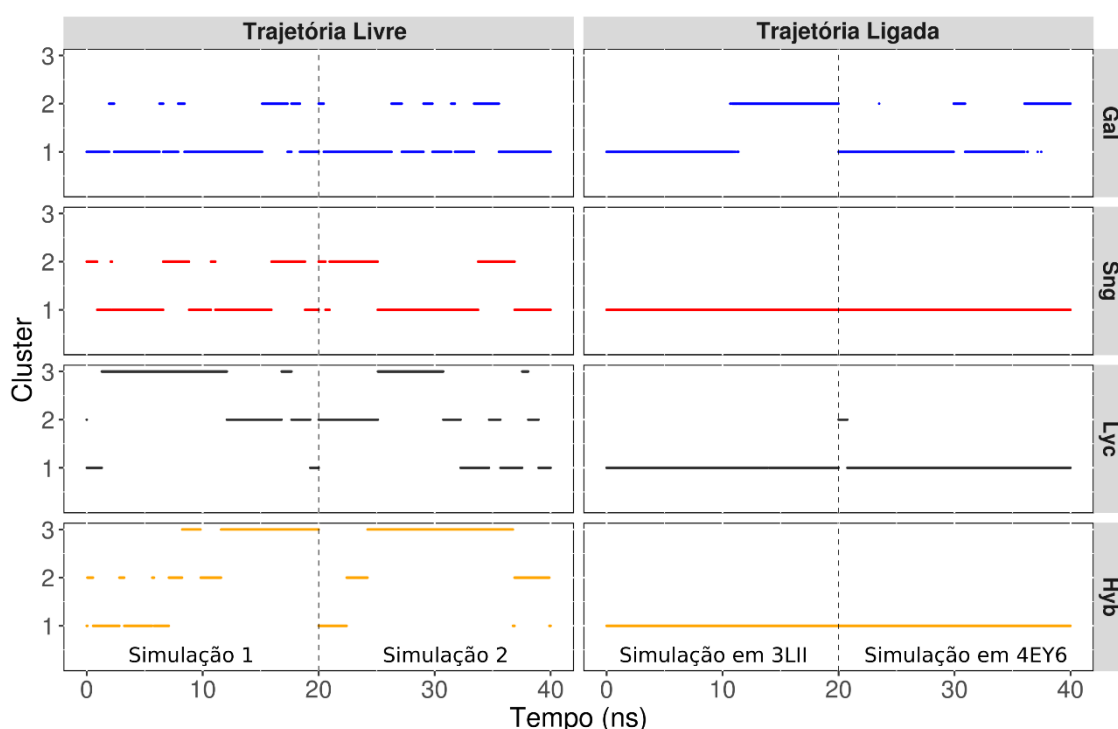


**Figura 17.** RMSD ao longo da trajetória de cada simulação de MD relacionada ao seu respectivo *frame* inicial. As trajetórias dos quatro galantamínicos diferentes (Gal, Sng, Lyc e Hyb) vinculadas a cada uma das estruturas de hAChE amostradas ("4EY6" e "3LII") ou em cada uma das repetições das simulações MD para o ligante livre ("Livres 1" e "Livres 2") são devidamente identificados. Para as simulações ligadas à proteína, o RMSD é varrido ao longo da trajetória considerando o *backbone* da proteína, enquanto que para as trajetórias "livres" são considerados os átomos pesados do ligante.

A fim de obter um primeiro vislumbre sobre os modos de ligação, bem como sobre as eventuais vantagens/penalidades para a alocação dos ligantes no sítio-ativo da hAChE, a clusterização das conformações retornadas pelas simulações MD de cada ligante no estado livre e ligado foi realizada. Não se detectou histerese em tais análises, sendo possível observar *frames* de diferentes clusters em diferentes pontos das simulações independente da conformação da proteína (para o caso das simulações ligadas) ou da replicata (no caso das simulações livres; Figura 18). A única exceção foi o cluster 2 de Lyc no estado ligado, o qual demonstra-se um cluster significativamente menos povoado,

que apenas apareceu na trajetória em relação à estrutura Apo, com estatísticas substancialmente precárias (apenas 1% de representatividade, conforme descrito abaixo). No entanto, com base no bom comportamento apresentado pelos demais ligantes e na população escassa deste cluster, concluímos que a ocorrência do cluster 2 de Lyc em apenas uma repetição simplesmente refletiu uma baixa probabilidade natural e não um efeito de histerese.

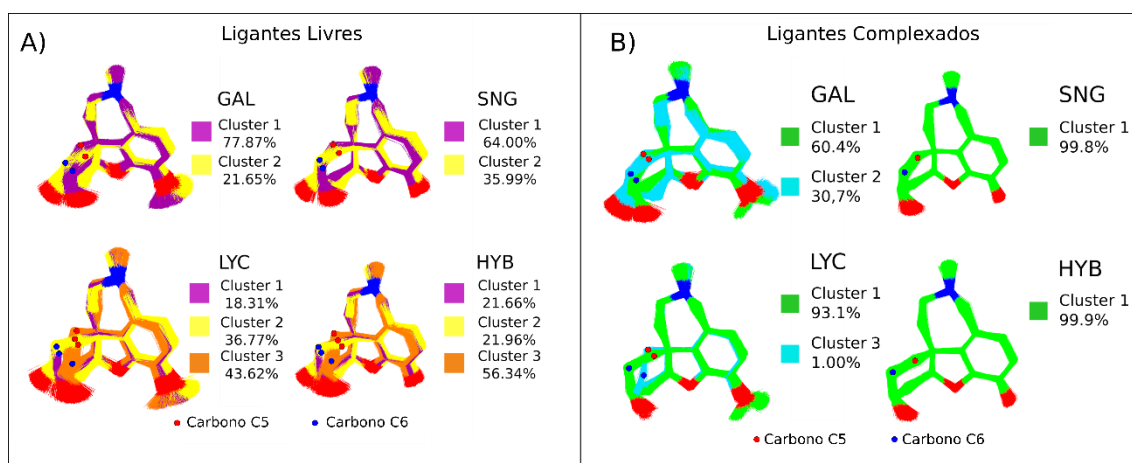
É interessante notar que, para todos os ligantes, as conformações representativas encontradas nas trajetórias ligadas também pertencem ao espaço conformacional dos ligantes livres, de modo que existe analogia conformacional dos clusters livres e ligados (Figura 19). De fato, Gal apresenta duas conformações em liberdade (Figura 19-A) em porções desiguais, as quais também são observadas analogamente nas trajetórias ligadas (Figura 19-B). Para Sng no entanto, enquanto dois confôrmeros são observados em liberdade, o sítio-ativo da hAChE (independentemente de sua conformação *apo* ou *holo*) parece selecionar apenas um desses posicionamentos, de modo que é possível observar apenas um grupo significativamente populoso nas trajetórias ligadas. Isto pode



**Figura 18.** Distribuição de clusters ao longo das trajetórias de MD para as simulações livres (esquerda) e ligadas (direita) para Gal (pontos azuis), Sng (pontos vermelhos), Lyc (pontos cinzas) e Hyb (pontos amarelos). Linhas tracejadas pretas indicam o limiar de mudança da simulação 1 para a simulação 2 (para as trajetórias livres) e o limiar de mudança da simulação em 3LII para a simulação em 4EY6 (para as trajetórias ligadas), sugerindo não histerese em qualquer uma das simulações (veja o texto para detalhes e discussões).

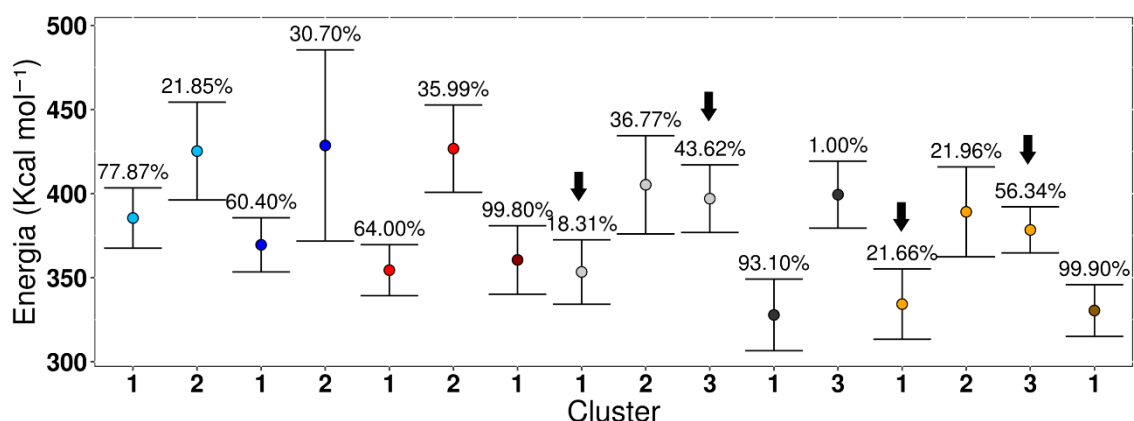


aparentar uma penalidade entrópica para a Sng comparada a Gal, mas como veremos nos próximos tópicos, as principais diferenças entre esses dois inibidores não residem aqui. Porém, as desvantagens para os demais ligantes começam a se tornar mais claras com uma observação mais atenta das análises de clusterização. Lyc e Hyb apresentam, cada uma, três agrupamentos representativos em liberdade (Figura 19-A). Ao complexarem-se com hAChE, este número é drasticamente diminuído de forma que ambas adotam apenas um cluster altamente populoso nas trajetórias ligadas (Figura 19-A (observa-se porém, que Lyc ainda consegue adotar um segundo cluster com 1% de representatividade)). Isto pode indicar uma drástica penalidade entrópica para os ligantes C5-C6<sup>sp3</sup>, de modo que o sítio-ativo impõe uma séria restrição conformacional para eles. Esta penalidade fica mais evidente quando observadas as frequências conformacionais de cada ligante. O sítio-ativo da enzima impõe um sério deslocamento no equilíbrio conformacional de Lyc e Hyb de forma que, os clusters mais populosos e estáveis em solução perdem totalmente sua representatividade quando no complexo, refletindo num drástico aumento das frequências dos clusters menos favoráveis em liberdade (ver representatividade de cada cluster na Figura 19). Esta extirpação da conformação mais favorável em liberdade em troca da menos estável promovida pelo sítio-ativo não é observada para os ligantes C5-C6<sup>sp2</sup> (Gal e Sng), sugerindo uma penalidade menor para a ligação desses últimos.



**Figura 19.** Superposição dos *frames* pertencentes aos agrupamentos conformacionais significativamente representativos (1% ou mais) ao longo de todas as trajetórias para cada ligante nos estados livre (A) e ligado (B). Apenas os átomos pesados (sem hidrogênios) são mostrados e os átomos de carbono de *frames* pertencentes a diferentes clusters são representados em diferentes cores. À direita de cada conjunto, é mostrada a cor utilizada para ilustrar cada cluster bem como a sua respectiva representatividade percentual relacionada a todo o conjunto das trajetórias de 20 ns (veja o texto para detalhes e discussões).

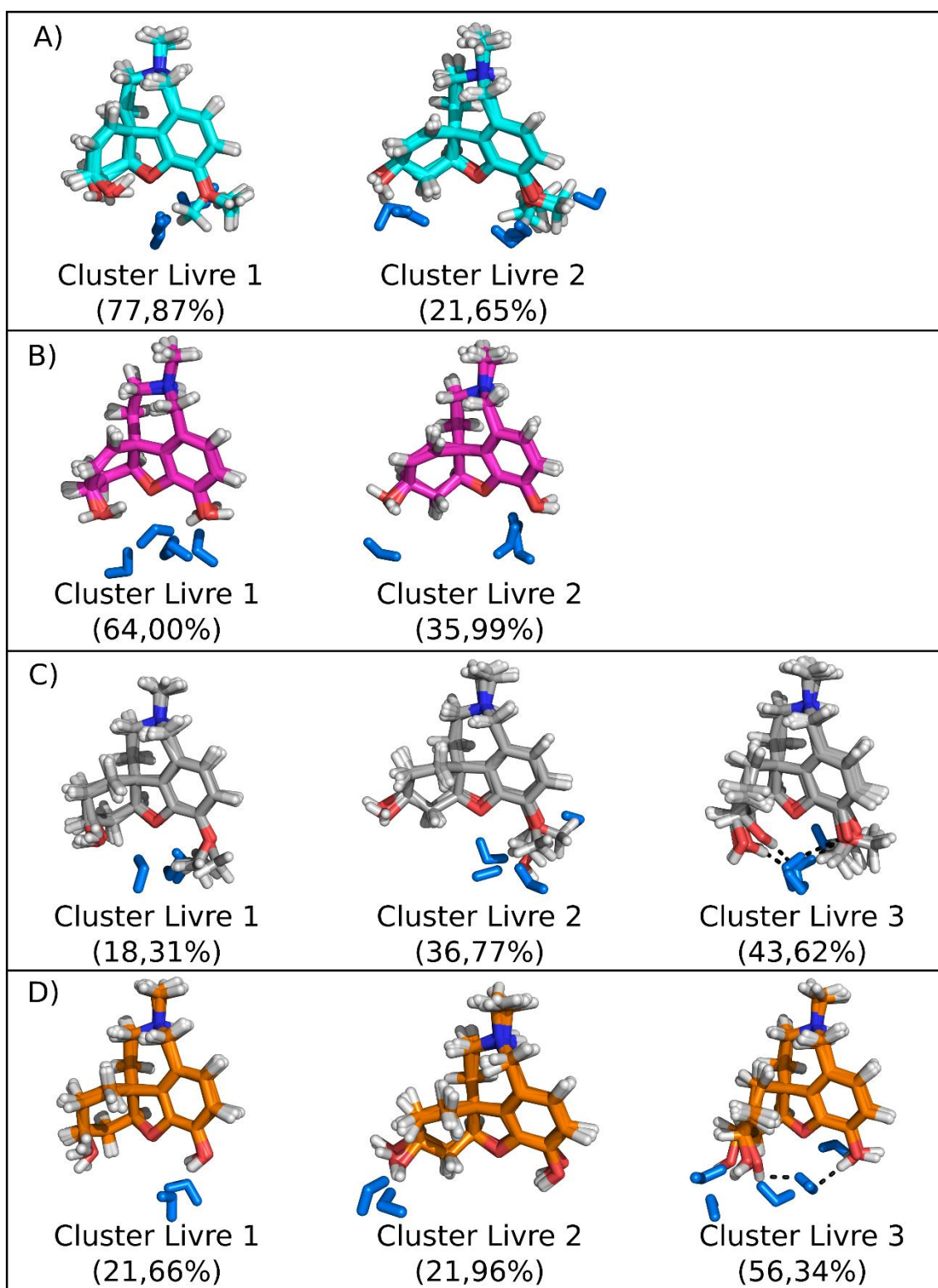
Uma visão mais atenta das estruturas conformacionais de cada ligante sugere a existência de analogia conformacional mesmo entre os galantamínicos, de modo que o cluster 1 (o mais favorável para Gal e Sng e menos favorável para Lyc e Hyb) representa a mesma conformação para todos os ligantes, assim como o cluster 2 (ver clusters 1 e 2 na Figura 19 A-B). O cluster 3, além de ser o mais favorável para Lyc e Hyb, surge apenas para estes dois devido a mobilidade provida pela substituição C5-C6<sup>sp2-sp3</sup> (ver cluster 3 nas Figura 18 e Figura 19-A e B). Análises de energia interna no vácuo poderiam então inferir sobre a favorabilidade energética de cada um desses clusters (Figura 20). No entanto, os resultados obtidos por tais análises sugerem que, apenas para Lyc e Hyb, as conformações menos energéticas não são as mais populosas (ver flechas pretas na Figura 20). Na realidade, o cluster de menor energia permanece o cluster 1 para todos os ligantes, incutindo a ideia de estabilização externa do cluster 3 nos ligantes C5-C6<sup>sp3</sup>.



**Figura 20.** Médias de energias internas no vácuo para *frames* representativos dos clusters livres e ligados de cada ligante. Esferas de cores claras descrevem as energias médias para ligantes livres, enquanto esferas de cores escuras representa o estado ligado. As esferas azul, vermelha, cinza e amarela mostram, respectivamente, valores de energia para Gal, Sng, Lyc e Hyb. A representatividade percentual de cada cluster é mostrada acima das linhas de desvio. Unicamente para Lyc e Hyb em solução, pode notar-se a não correspondência entre o cluster menos energeticamente favorável (no vácuo) e o mais povoado (setas), sugerindo a influência dos efeitos de hidratação na estatística conformacional desses ligantes em meio aquoso.

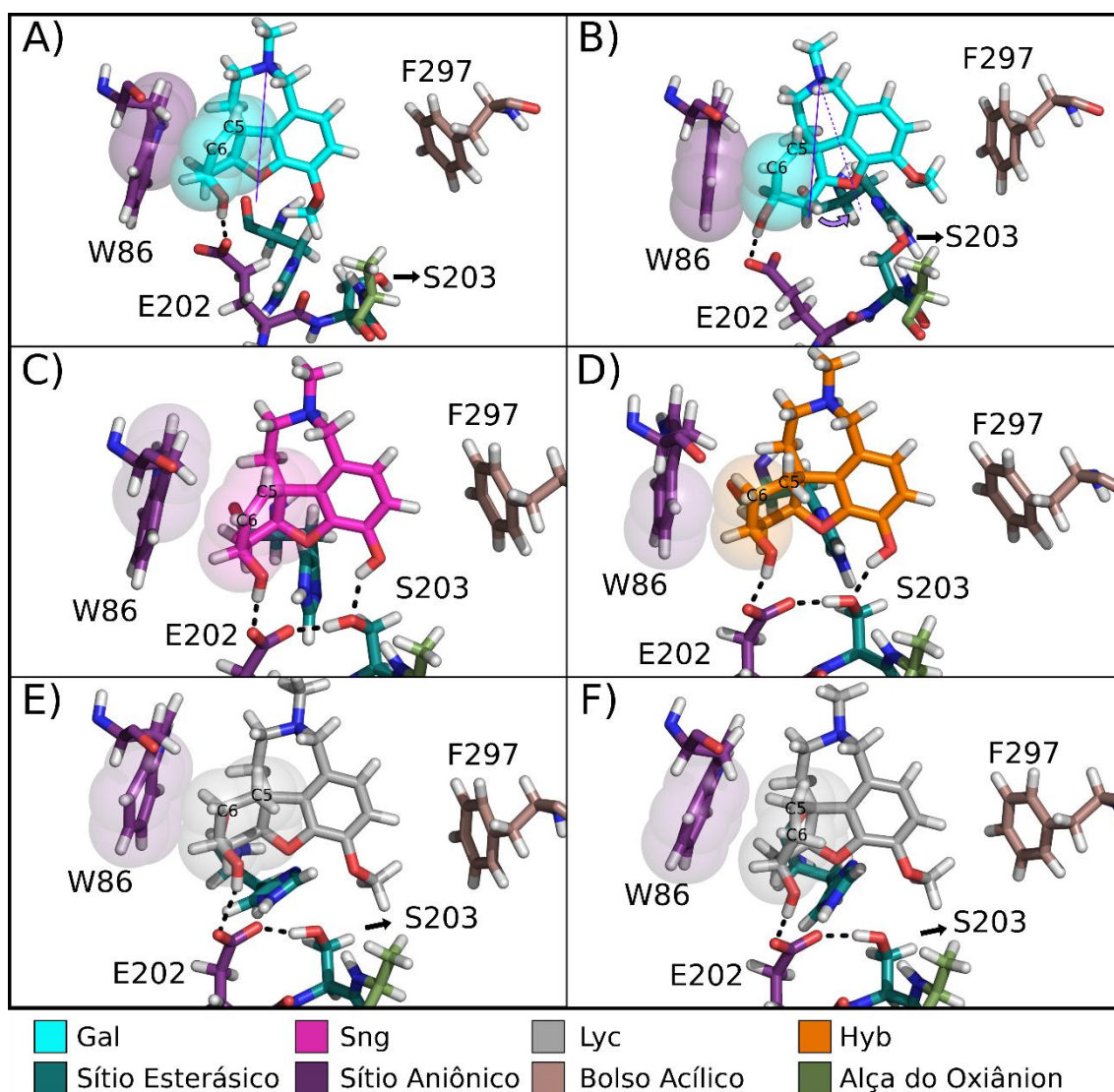
### 3.3 Análises Estruturais das Trajetórias de MD

A inspeção visual do ambiente próximo aos ligantes nos *frames* representativos de cada cluster permite o esclarecimento dos fatores estabilizantes dos galantamínicos C5-C6<sup>sp3</sup>. O que parece ocorrer é uma estabilização mediada por água quando grupamentos hidrofílicos desses ligantes formam uma “pinça” de modo a manter uma cadeia de HBs (Figura 21). Isto ocorre quando Lyc e Hyb adquirem a capacidade de aproximar os respectivos oxigênios presentes nas extremidades dessas moléculas (respectivamente, aproximar um grupo hidroxil e um grupo éter no caso de Lyc, e aproximar dois grupamentos hidroxil no caso de Hyb; ver Figura 21-C e D). Isto só é possível devido a maior mobilidade do anel não-aromático concedida pela substituição C5-C6<sup>sp2-sp3</sup> e conseqüentemente, ao surgimento do terceiro cluster em Lyc e Hyb. Em solução, isso permite que esses dois grupamentos, quando espacialmente aproximados, atuem como uma espécie de “pinça d’água”, com a capacidade de coordenar e reter uma molécula de água que estabeleça ligações de hidrogênio simultâneas com ambos os grupos. Interessantemente, efeitos similares são observados na estabilização de confôrmeros menos favoráveis em carboidratos presentes em solução, ao mesmo tempo que contribuem para aumentar a hidratação e a solubilidade dos mesmos (Kirschner and Woods 2001). Deste modo, além da penalidade de perda conformacional para Lyc e Hyb, é esperada uma maior penalidade de dessolvatação para esses ligantes ao entrarem no sítio-ativo. Isto ocorre pois, visto que a cavidade-ativa não permite a adoção do cluster 3 (onde ocorre a formação da “pinça d’água” em solução) pelos ligantes C5-C6<sup>sp3</sup> (Figura 19-B), esses inibidores devem dismantelar a cadeia de HBs para complexarem-se com hAChE. Gal e Sng, em contraste, não apresentam a capacidade de “pinçar” moléculas de água devido a maior rigidez do anel não-aromático (Figura 21-A e B), o qual impede que esses galantamínicos aproximem seus respectivos grupamentos oxigenados-hidrofílicos suficientemente contíguos para a formação dessa cadeia de HBs. Nesse sentido, espera-se uma penalidade de desidratação menor na ligação dos galantamínicos C5-C6<sup>sp2</sup> em comparação com suas respectivas contrapartes C5-C6<sup>sp3</sup>.



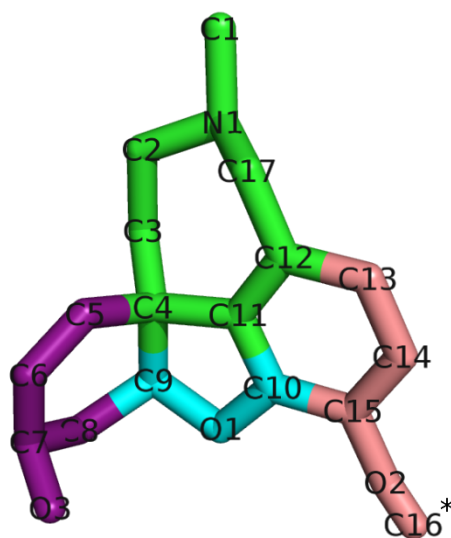
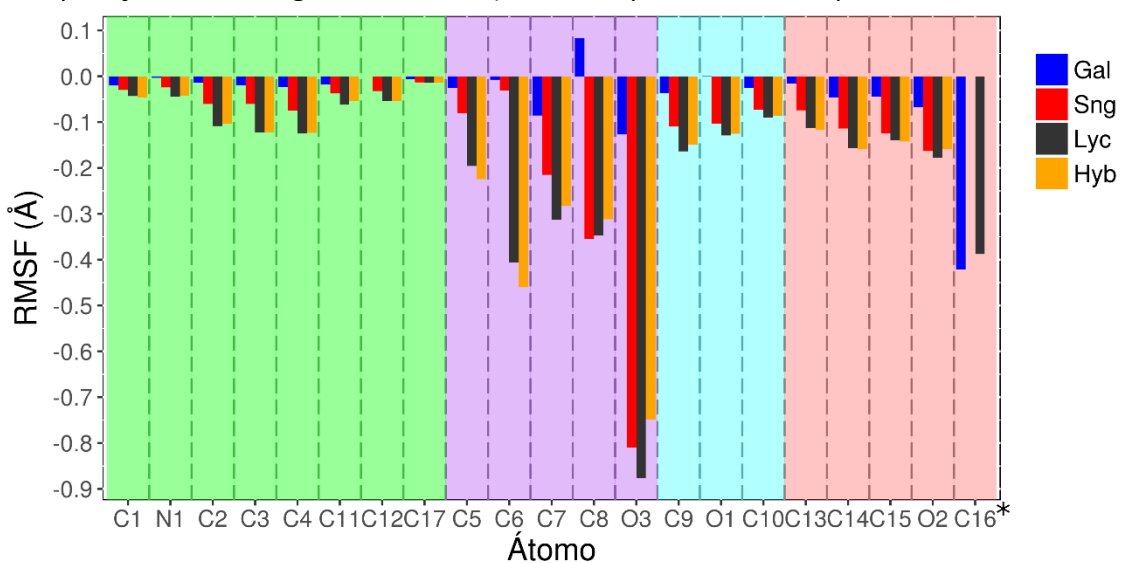
**Figura 21.** Superposição de cinco *frames* representativos dos clusters livres para Gal (A), Sng (B), Lyc (C) e Hyb (D). No caso de Lyc e Hyb, nota-se no agrupamento mais populoso 3 (presente apenas nestes ligantes) a ocorrência de "pinças d'água" que "capturam" moléculas de água de hidratação (em azul-marinho) devido a capacidade de manter HBs simultâneas (linhas tracejadas) entre os respectivos grupos hidrofílicos dos anéis aromáticos e não-aromáticos (ver texto para detalhes e discussões).

Análises estruturais das interações proteína-ligante para *frames* representativos dos clusters ligados lançam luz sobre os mecanismos de seletividade de galantamínicos pelo sítio-ativo, as desvantagens da substituição C5-C6<sup>sp2-sp3</sup>, bem como as vantagens da substituição metoxi-hidroxi (Figura 22). Inicialmente, uma restrição para a mobilidade do anel não-aromático dos ligantes é imposta pelo empacotamento desses sobre o resíduo W86 da proteína. De fato, análises de RMSF sugerem que a maior perda de mobilidade ocorre justamente na região desse anel (Figura 23). No caso de Sng e Gal, a



**Figura 22.** Estruturas representativas de A) cluster ligado 1 de Gal; B) cluster ligado 2 de Gal; C) cluster único de Sng; D) cluster único de Hyb; E) cluster ligado 1 de Lyc; F) cluster ligado 2 de Lyc. Em todas as estruturas, os átomos C5 e C6 (o local da modificação C5-C6<sup>sp2-sp3</sup>) são destacados e os átomos envolvidos no contato entre o anel não aromático do ligante e a cadeia lateral W86 são mostrados em esferas de van der Waals transparentes. Para Gal, a transição conformacional do agrupamento 1 para 2 é acompanhada por um tombamento (flecha curva em B) do eixo central do ligante (linha violeta contínua em A e tracejada em B). As HBs importantes entre a proteína e os respectivos grupos oxigenados nos anéis aromáticos e não-aromáticos são representadas para os diferentes ligantes em seus modos de ligação distintos (linhas pretas tracejadas). Veja o texto para detalhes e discussões.

geometria C5-C6<sup>sp2</sup> permite que a cadeia lateral W86 estabeleça interações de empilhamento com este anel em orientações nas quais estes ligantes já assumem em solução de forma favorável (ver clusters de Gal e Sng na Figura 19-A e B e Figura 22-A e C). No caso específico de Gal, esta pode manter tal interação de empilhamento em ambas as conformações observadas (clusters 1 e 2). Isso só é possível pois, com a geometria planar da ligação C5-C6 na configuração sp<sup>2</sup> e na ausência de uma HB adicional que restrinja esse movimento (veja a discussão sobre a substituição de metoxi-hidroxi abaixo), Gal aproxima seu núcleo galantamínico na direção do W86 (em comparação com os ligantes C5-C6<sup>sp3</sup>) a fim de promover o empacotamento com este



\*C16 presente apenas em Gal e Lyc

**Figura 23.** Variação de RMSF do estado livre para ligado de cada átomo para todos os ligantes devidamente separados por cor como indicado à direita. As diferentes cores no fundo do gráfico indicam átomos pertencentes a regiões dos galantamínicos devidamente destacados à esquerda, com seus nomes atômicos corretamente indicados. Observa-se uma significativa perda de mobilidade na região do anel não-aromático (arroxçada), possivelmente pelo empacotamento com o resíduo.

resíduo na conformação do cluster 1 (compare este empilhamento para Gal e para ligantes C5-C6<sup>sp3</sup> na Figura 16-A e B e na Figura 22-A, D e E). Isso libera espaço suficiente entre o grupo metoxi da Gal e o resíduo F297 no lado oposto, de tal forma que esse grupo pode mover-se e interagir mais livremente com demais resíduos da cavidade neste modo de ligação (Figura 22-A). A completa ocupação do sítio-ativo pela Gal, de modo a manter interações simultaneamente com W86 e F297, é alcançada apenas com um ligeiro tombamento rotacional do eixo central desse ligante, acompanhada por uma transição desta molécula do cluster 1 para a conformação do cluster 2 (Figura 22-B). Desta forma, Gal demonstrou a liberdade de trânsito entre esses dois modos de ligação (o modo do cluster 1 conformacionalmente favorecido e o modo do cluster 2 mais rico em contatos ligante-proteína), ambos apresentando ocupações relativamente significativas ao longo das simulações (Figura 18 e Figura 19-B). Esta ligação "mais frouxa" de Gal comparada com os outros ligantes parece também ser acompanhada por um sítio-ativo mais flexível. Comparando-se a Figura 22-A e B com a Figura 22-C e F, nota-se que o resíduo E202 no sítio aniônico parece a acompanhar a hidroxila da Gal ao longo de sua transição conformacional, enquanto os resíduos S203 e H447 realocam suas respectivas posições para permitir as diferentes orientações de Gal nos modos de ligação dos clusters 1 e 2.

Para Lyc e Hyb no entanto, a geometria tetraédrica na ligação C5-C6 promove, pelos impedimentos adicionais promovidos pela adição de dois novos hidrogênios, um "impulso" relativo ao núcleo galantamínico na direção do F297, preenchendo o sítio-ativo no modo de ligação do cluster 1 e não liberando espaço suficiente para que esses ligantes acedam à conformação do cluster 2 como é possível observar em Gal (Figura 22-D e F). Embora, pelo menos em termos de impedimento estérico, a conformação do cluster 3 ainda seja acessível, é menos favorecida energeticamente na ausência dos efeitos de hidratação (tópico 3.2) e resulta na perda de empacotamento entre o anel não-aromático e a cadeia lateral do W86 (Figura 22-F).

Para os ligantes hidroxilados modificados (Sng e Hyb), esta rotação do eixo geométrico e a adoção da conformação do cluster 2 são ainda mais dificultadas devido ao surgimento de uma cadeia de HBs formada nesses ligantes na presença do novo grupo fenólico (Figura 22-C e D), além da ausência do contato hidrofóbico compensatório entre o grupo

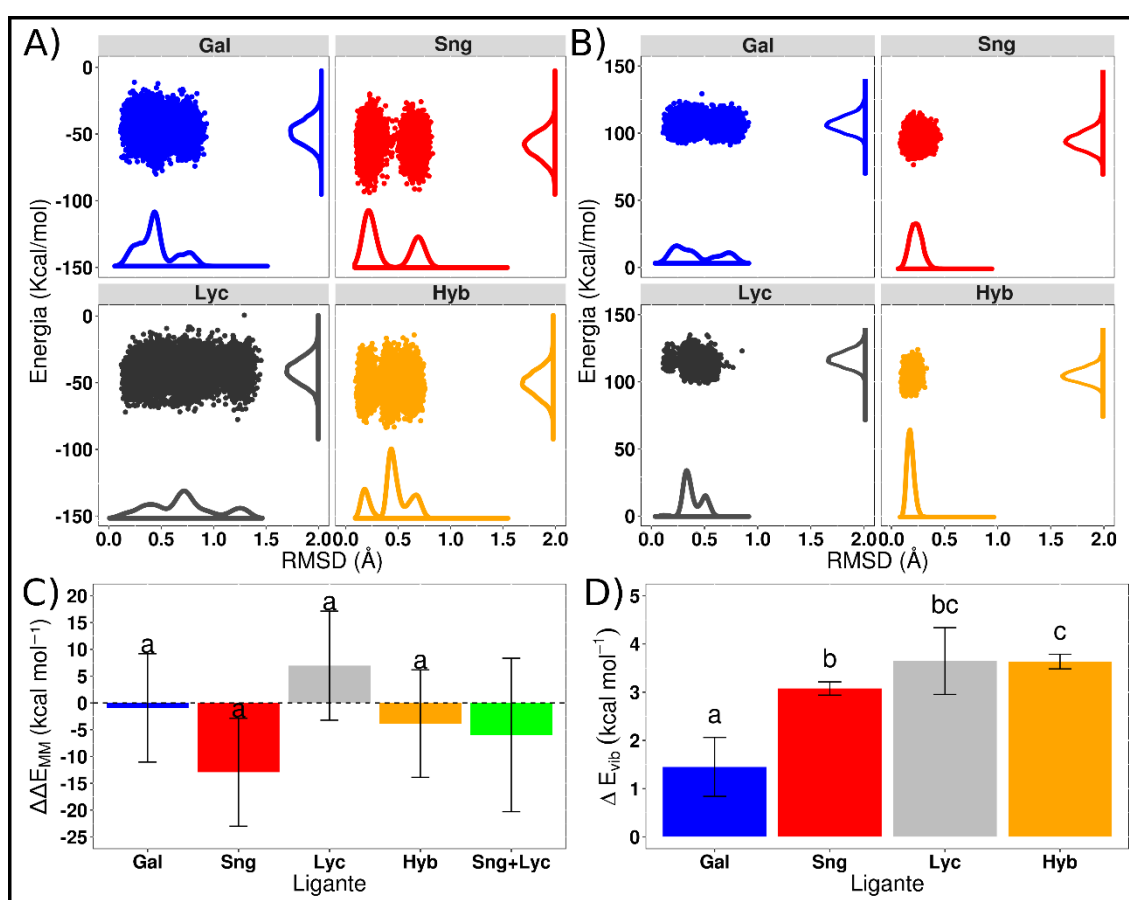
metoxi (ausente neste caso) e o resíduo F297. De fato, os dois ligantes hidroxil modificados apresentaram, neste estudo, o comportamento interessante de manter uma rede fechada de HBs envolvendo os grupos OH presentes nesses ligantes e a proteína (Figura 22-C e D). Este fenômeno ocorre com a formação de HB entre o grupo hidroxil ligado ao anel aromático (a hidroxila modificada em Sng e Hyb) e o resíduo S203, simultaneamente a formação de HB entre a hidroxila ligada ao anel não-aromático e o resíduo E202 (ambas as hidroxilas comportando-se como doadores e ambos os resíduos como aceptores). A ocorrência destas HBs permite o posicionamento ótimo dos dois resíduos acima mencionados de modo a facilitar uma terceira HB entre eles (S203 como doador e E202 comoceptor), estabelecendo e fechando uma rede cíclica de HBs. Esta "cooperatividade interna" parece permitir que Sng e Hyb estabilizem-se em uma única conformação, como observado nos clusters desses ligantes na Figura 19-B. Gal e Lyc, em contraste, são incapazes de estabelecer essa rede devido à ausência de um doador adicional. Isso se reflete em uma maior mobilidade desses últimos ligantes no estado complexado em comparação com suas respectivas contrapartes com substituição hidroxil, conforme observado nos clusters de Gal e Lyc na Figura 19-B e na Figura 22-A, E e F (embora, para Lyc, o confôrmero adicional apresenta, como já mencionado, estatísticas significativamente ruins). Embora essa rede de HBs estabilize uma única conformação tanto para Sng quanto para Hyb, tornando-se possivelmente o principal fator de otimização de afinidade para eles, espera-se que para Sng tal fenômeno ocorra sem a penalidade relativa aos efeitos da desidratação e aos efeitos de deslocamento conformacional associados aos ligantes C5-C6<sup>sp3</sup>, em consonância com a seletividade natural de Sng. Esses efeitos, por sua vez, incorrerão nos significativos custos entrópicos e vibratórios discutidos adiante.

### 3.4 Estimativas de Entropia

Em consonância com as observações obtidas na análise de clusters (Figura 19), um gráfico da distribuição de "RMSD versus Energia Total" mostra uma forte seletividade de conformações dos ligantes pelo sítio-ativo. Esta restrição é, no entanto, particularmente proibitiva, especialmente para Lyc e Hyb (Figura 24-A e B). De fato, a maior flexibilidade

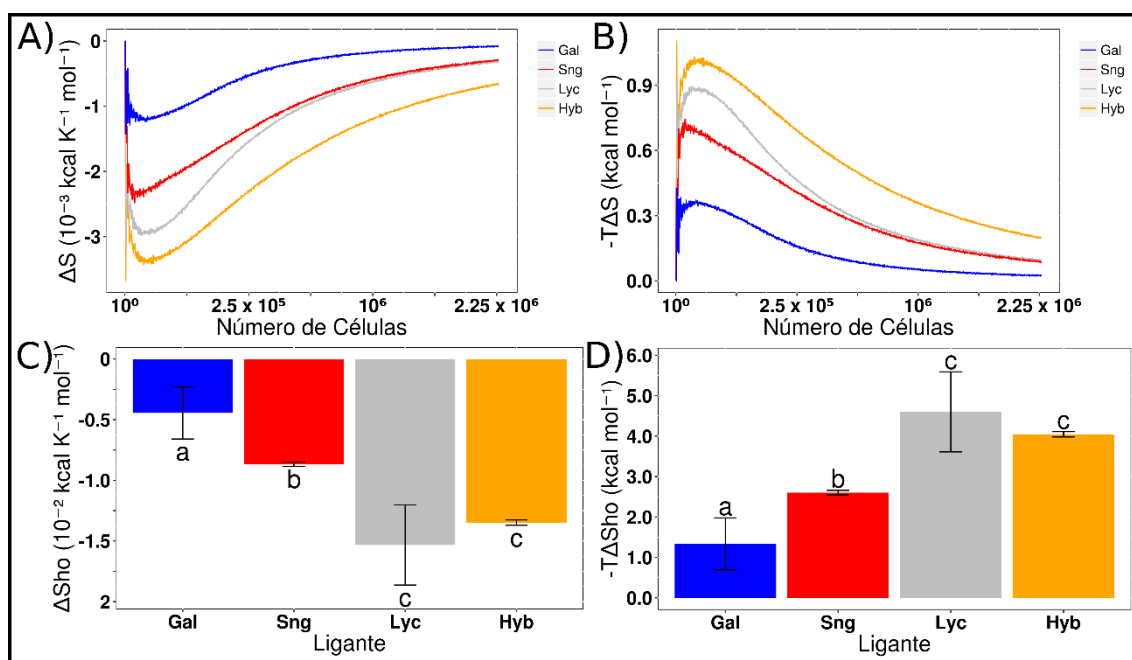


do anel não-aromático apresentado por esses ligantes em solução, descrita nos tópicos 3.2 e 3.3, não é permitida em seus respectivos estados ligados. Espera-se que essa maior restrição conformacional causada pelo enclausuramento na cavidade ativa reflita em maiores penalidades energéticas para a ligação dos galantamínicos C5-C6<sup>sp3</sup> em, ao menos, dois principais parâmetros termodinâmicos: (i) espera-se que a perda de amplitude conformacional resulte em uma maior distribuição das vibrações moleculares em modos de frequências mais altas (baixa amplitude), que por sua vez, resulta em um aumento na contribuição vibratória na variação da energia interna do ligante no estado complexado ( $\Delta E_v$ ; Karplus and Kushick 1981); (ii) espera-se que tal restrição



**Figura 24.** Distribuição da população resultante das trajetórias de MD para todos os ligantes no espaço de fase 2D de energia potencial *versus* RMSD em relação à pose cristalográfica de Gal. A) respectivas distribuições para os ligantes nas trajetórias livres; B) respectivas distribuições para os ligantes nas trajetórias ligadas; C) respectivas variações na energia vibratória interna do ligante ( $\Delta E_v$ ) do estado livre para o estado ligado, resultante da aproximação quasi-harmônica (ver tópico 2.6). As barras de dados e erros mostram, respectivamente, a média e os desvios padrão para  $\Delta E_v$  (os desvios foram estimados a partir de cada MD em separado e de ambas as trajetórias combinadas para cada ligante); D) respectivas diferenças na variação da energia total de mecânica molecular de ligação ( $\Delta\Delta E_{MM}$ ) para cada ligante quando os valores de  $E_{MM}$  para a Gal nos estados livres e ligados são considerados como referências ou "0". As barras de dados e erros mostram, respectivamente, as médias e os desvios sobre todos os *frames* da MD para cada ligante. Tanto em C como em D, as letras acima das linhas de desvio mostram grupos com base nas diferenças estatisticamente significativas. Veja o texto para detalhes e discussões.

conformacional/vibracional resulte em uma penalidade entrópica maior na associação ligante-proteína. De fato, uma aproximação quasi-harmônica da variação de energia vibracional na ligação (Figura 24-C) mostra um incremento relativamente menor deste termo para a ligação da Gal, um incremento intermediário para Sng e um incremento maior para os ligantes C5-C6<sup>sp3</sup> (embora Sng e Lyc não tenham sido diferenciadas entre si com significância estatística nesse aspecto). No que concerne aos custos entrópicos de ligação, duas aproximações independentes e distintas da variação entrópica conformacional/configuracional, o método de colônia adaptado e a abordagem quasi-harmônica (ver o tópicos 1.8 e 2.6) mostraram um comportamento semelhante de custo entrópico, ou seja, um custo menor para Gal, intermediário para Sng e custos consideravelmente maiores para ligantes C5-C6<sup>sp3</sup> (Figura 25). Nesse sentido, a ordem da penalidade entrópica e vibracional para ligação segue, de forma consistente, a magnitude em que o cavidade ativa da proteína perturba e restringe o conjunto conformacional dos ligantes. Propomos que, para Sng, a penalidade entrópica/



**Figura 25.** A análise de entropia pelo método de colônia adaptada (A e B) sugere uma ordem crescente Gal, Sng, Lyc, Hyb em termos de penalidade entrópica para o entrada desses ligantes no sítio-ativo da hAchE. A entropia quasi-harmônica baseada na matriz de covariância para as coordenadas internas dos ligantes (C e D) demonstra uma ordem crescente Gal, Sng, ligantes  $\pi$  modificados em termos penalidade entrópica. As barras de dados e erros mostram, respectivamente, a média e os desvios padrão para  $\Delta Sho$  (o desvio foi estimado calculando-se  $\Delta Sho$  para as MDs separadas e combinadas para cada ligante). Para ambas as análises, as imagens A e C mostram a variação estimada de entropia de ligação ( $\Delta S$  em kcal  $K^{-1}$  mol $^{-1}$ ), enquanto as imagens B e D mostram a contribuição entrópica correspondente na energia livre de ligação ( $-T\Delta S$ , onde T é a temperatura absoluta em K). Letras acima das linhas de desvio identificam os grupos de ligantes com base nas diferenças estatisticamente significativas (veja o texto para detalhes e discussões).

vibracional intermediária seja suficientemente pequena para ser compensada pela rede cooperativa de novas HBs que surge com a substituição metoxi-hidroxi (tópico 3.3). Além disso, em Sng, esta rede cooperativa não é acompanhada (como mencionado no tópico 3.3) pelas penalidades de desidratação discutidas para Hyb, sugerindo ainda maiores vantagens entálpicas para Sng, em comparação com os análogos C5-C6<sup>sp3</sup>.

Infelizmente, as significativas flutuações intrínsecas aos dados energéticos da MD, além das amostragens relativamente modestas acessadas neste estudo, não permitiram uma diferenciação estatisticamente significativa nas adições e diminuições de energia de ligação conferidas pelas respectivas modificações em cada ligante em comparação com a Gal (Figura 24-D). No entanto, considerando apenas os comportamentos médios, pode-se notar na Figura 24-D que as diferenças relativas às respectivas energias potenciais de cada galantamínico acompanhou a classificação dos efeitos discutidos neste estudo. Além disso, a modificação no comportamento energético médio na ligação para Hyb é praticamente análoga à soma do comportamento de Lyc ao Sng. Isto sugere que as penalidades de desidratação e as vantagens de cooperação interna conferidas respectivamente pelas modificações C5-C6<sup>sp2-sp3</sup> e metoxi-hidroxi possam ser cumulativas.

## 4 Conclusão

Os termos entálpicos e entrópicos acessados no presente trabalho mostram ser substancialmente importantes para a afinidade relativa de ligantes galantaminicos em hAChE. De fato, a rigidez do anel aromático (presente em Gal e Sng) é um fator chave para minimizar penalidades entrópicas e de desidratação na ligação desses ligantes. Além disso, os dados sugerem a possibilidade do surgimento de uma cadeia de HBs "internamente cooperativa" entre os ligantes metoxi-hidroxi modificados e o sítio ativo da proteína, em especial a Sng (embora o efeito energético desse fenômeno não tenha sido quantificado com significância estatística). Esta "cooperatividade interna" entre farmacóforos do ligante é uma característica dificilmente vislumbrada pela simples análise de poses estáticas oriundas de cristais ou atracamento virtual e parece ser o principal fator que compensa a penalidade entrópica associada a Sng comparada à Gal, destacando a importância do acesso à dinâmica do ligante (por experimentos virtuais ou reais) na sondagem dos mecanismos de ligação. Tais efeitos (otimização entrópica e menor penalidade de desidratação na configuração C5-C6<sup>sp2</sup>, bem como a "cooperação interna" de HBs devido à substituição metoxi-hidroxi no anel aromático) parecem ser cumulativas após análise e comparação dos resultados para ligante híbrido. Este ligante apresenta ambas as modificações e traz as respectivas vantagens e desvantagens de cada uma delas. Além disso, é possível desenvolver-se ligantes otimizados que não apresentam a perda entrópica associada a Sng resultante de sua mobilidade do anel não-aromático (mesmo que reduzida em comparação à Lyc), mas que mantêm a cooperatividade interna apresentada por tal ligante.

É importante ressaltar que os efeitos entrópicos são, em geral, pouco considerados ao projetar ligantes biologicamente ativos. Martínez et al. já relataram diferentes penalidades entrópicas como um fator importante para a seletividade de inibidores sintéticos nos receptores de hormônio da tireoide (L. Martínez et al. 2009). Esses efeitos, novamente, são difíceis de notar com base somente na informação estrutural. Neste sentido, a modelagem e a simulação de MD podem contribuir para elucidar tais características relacionadas à liberdade conformacional e à ocupação do espaço de fase como um todo, considerando a dificuldade natural para acessar o mesmo por abordagens experimentais. De fato, os termos entrópicos conformacionais mostram ser

um fator crucial para diferenciar a afinidade dos ligantes C5-C6<sup>sp2</sup> (Gal e Sng) para os ligantes C5-C6<sup>sp2</sup> (Lyc e Hyb).

Deste modo, espera-se que este trabalho contribua para uma compreensão mais profunda das regras que regem a afinidade de galantamínicos ou outros inibidores competitivos de AchE, a fim de facilitar o planejamento mais racional de medicamentos anti-Alzheimer.

#### 4.1 Trabalhos Futuros

- Utilização de técnicas de alta amostragem para estimativa de energia de ligação de galantamínicos no sítio-ativo de hAChE;
- Proposição de novos galantamínicos com atividade anti-Alzheimer otimizada baseados nas conclusões obtidas neste trabalho e aplicação de metodologias de modelagem molecular para exploração do ranqueamento de inibição desses ligantes comparados aos inibidores aqui estudados;
- Proposição de ligantes com afinidade a receptores da via colinérgica, estendendo as conclusões aqui apresentadas para regiões de atracamento de Ach análogos à cavidade ativa de AchE presentes nestes receptores.
- Síntese e testes *in vitro/in vivo* dos novos ligantes propostos.

## 5 Bibliografia

- Ali, Thibault B, Thomas R Schleret, Brian M Reilly, Winston Yuchen Chen, and Ruben Abagyan. 2015. "Adverse Effects of Cholinesterase Inhibitors in Dementia, According to the Pharmacovigilance Databases of the United-States and Canada." *PLoS One* 10 (12): e0144337.
- Anandkrishnan, Ramu, Boris Aguilar, and Alexey V Onufriev. 2012. "H++ 3.0: Automating pK Prediction and the Preparation of Biomolecular Structures for Atomistic Molecular Modeling and Simulations." *Nucleic Acids Res.* 40 (Web Server issue): W537--41.
- Andricioaei, Ioan, and Martin Karplus. 2001. "On the Calculation of Entropy from Covariance Matrices of the Atomic Fluctuations." *J. Chem. Phys.* 115 (14): 6289–92.
- Ariel, Naomi, Baruch Velan, Dov Barak, Moshe Leitner, Tamar Bino, Arie Ordentlich, and Avigdor Shafferman. 1998. "Structural Modifications of the  $\Omega$  Loop in Human Acetylcholinesterase." In *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*, 453.
- Barak, D, A Ordentlich, A Bromberg, C Kronman, D Marcus, A Lazar, N Ariel, B Velan, and A Shafferman. 1995. "Allosteric Modulation of Acetylcholinesterase Activity by Peripheral Ligands Involves a Conformational Transition of the Anionic Subsite." *Biochemistry* 34 (47): 15444–52.
- Berendsen, H J C, D van der Spoel, and R van Drunen. 1995. "GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation." *Comput. Phys. Commun.* 91 (1–3): 43–56.
- Berman, Helen M, Tammy Battistuz, T N Bhat, Wolfgang F Bluhm, Philip E Bourne, Kyle Burkhardt, Zukang Feng, et al. 2002. "The Protein Data Bank." *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58 (Pt 61): 899–907.
- Beveridge, David L, Gabriela Barreiro, K Suzie Byun, David A Case, Thomas E Cheatham

- 3rd, Surjit B Dixit, Emmanuel Giudice, et al. 2004. "Molecular Dynamics Simulations of the 136 Unique Tetranucleotide Sequences of DNA Oligonucleotides. I. Research Design and Results on d(CpG) Steps." *Biophys. J.* 87 (6): 3799–3813.
- Brandt, Artur M L, Paulo Ricardo Batista, Franklin Souza-Silva, Carlos Roberto Alves, and Ernesto Raul Caffarena. 2016. "Exploring the Unbinding of Leishmania(L.) Amazonensis CPB Derived-Epitopes from H2 MHC Class I Proteins." *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 84 (4): 473–87.
- Brooks, B, and M Karplus. 1983. "Harmonic Dynamics of Proteins: Normal Modes and Fluctuations in Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 (21): 6571–75.
- Brunne, R M, and W F van Gunsteren. 1993. "Dynamical Properties of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor from a Molecular Dynamics Simulation at 5000 Atm." *FEBS Lett.* 323 (3): 215–17.
- Case, David A, Thomas E Cheatham 3rd, Tom Darden, Holger Gohlke, Ray Luo, Kenneth M Merz Jr, Alexey Onufriev, Carlos Simmerling, Bing Wang, and Robert J Woods. 2005. "The Amber Biomolecular Simulation Programs." *J. Comput. Chem.* 26 (16): 1668–88.
- Chang, Chia-en A, Wei Chen, and Michael K Gilson. 2007. "Ligand Configurational Entropy and Protein Binding." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (5): 1534–39. doi:10.1073/pnas.0610494104.
- Cheung, Jonah, Michael J Rudolph, Fiana Burshteyn, Michael S Cassidy, Ebony N Gary, James Love, Matthew C Franklin, and Jude J Height. 2012. "Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands." *J. Med. Chem.* 55 (22): 10282–86.
- Colovic, Mirjana B, Danijela Z Krstic, Tamara D Lazarevic-Pasti, Aleksandra M Bondzic, and Vesna M Vasic. 2013. "Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology." *Curr. Neuropharmacol.* 11 (3): 315–35.

- Connolly, M L. 1983. "Solvent-Accessible Surfaces of Proteins and Nucleic Acids." *Science* 221 (4612): 709–13.
- Correa-Basurto, J, M Bello, M C Rosales-Hernández, M Hernández-Rodríguez, I Nicolás-Vázquez, A Rojo-Domínguez, J G Trujillo-Ferrara, René Miranda, and C A Flores-Sandoval. 2014. "QSAR, Docking, Dynamic Simulation and Quantum Mechanics Studies to Explore the Recognition Properties of Cholinesterase Binding Sites." *Chem. Biol. Interact.* 209: 1–13.
- Cortes, Natalie, Rafael Alvarez, Edison H Osorio, Fernando Alzate, Strahil Berkov, and Edison Osorio. 2015. "Alkaloid Metabolite Profiles by GC/MS and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities with Binding-Mode Predictions of Five Amaryllidaceae Plants." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102: 222–28.
- Cui, Fengchao, Kecheng Yang, and Yunqi Li. 2015. "Investigate the Binding of Catechins to Trypsin Using Docking and Molecular Dynamics Simulation." *PLoS One* 10 (5): e0125848.
- Dastmalchi, and Siavoush. 2016. *Methods and Algorithms for Molecular Docking-Based Drug Design and Discovery*. IGI Global.
- Delano, W L. 2002. "The PyMOL Molecular Graphics System."
- Dvir, Hay, Israel Silman, Michal Harel, Terrone L Rosenberry, and Joel L Sussman. 2010. "Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function." *Chem. Biol. Interact.* 187 (1–3): 10–22.
- Erkinjuntti, Timo, Alexander Kurz, Serge Gauthier, Roger Bullock, Sean Lilienfeld, and Chandrasekharrao Venkata Damaraju. 2002. "Efficacy of Galantamine in Probable Vascular Dementia and Alzheimer's Disease Combined with Cerebrovascular Disease: A Randomised Trial." *Lancet* 359 (9314): 1283–90.
- Ferreira, Rafaela S, Anton Simeonov, Ajit Jadhav, Oliv Eidam, Bryan T Mott, Michael J Keiser, James H McKerrow, David J Maloney, John J Irwin, and Brian K Shoichet. 2010. "Complementarity Between a Docking and a High-Throughput Screen in



- Discovering New Cruzain Inhibitors." *J. Med. Chem.* 53 (13): 4891–4905.
- Francis, P T, A M Palmer, M Snape, and G K Wilcock. 1999. "The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Review of Progress." *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66 (2): 137–47.
- Gaudig, M, U Richarz, J Han, B Van Baelen, and B Schauble. 2011. "Effects of Galantamine in Alzheimers Disease: Double-Blind Withdrawal Studies Evaluating Sustained Versus Interrupted Treatment." *Curr. Alzheimer Res.* 8 (7): 771–80.
- Genheden, Samuel, and Ulf Ryde. 2015. "The MM/PBSA and MM/GBSA Methods to Estimate Ligand-Binding Affinities." *Expert Opin. Drug Discov.* 10 (5): 449–61.
- Giacobini, Ezio, and Giancarlo Pepeu. 2006. *The Brain Cholinergic System*. Informa Health Care.
- Goethe, Martin, Ignacio Fita, and J Miguel Rubi. 2015. "Vibrational Entropy of a Protein: Large Differences between Distinct Conformations." *J. Chem. Theory Comput.* 11 (1): 351–59.
- Gordon, J C, J B Myers, T Folta, V Shoja, L S Heath, and A Onufriev. 2005. "H++: A Server for Estimating pKas and Adding Missing Hydrogens to Macromolecules." *Nucleic Acids Res.* 33 (Web Server): W368--W371.
- Greenblatt, H M, G Kryger, T Lewis, I Silman, and J L Sussman. 1999. "Structure of Acetylcholinesterase Complexed with (-)-Galanthamine at 2.3 Å Resolution." *FEBS Lett.* 463 (3): 321–26.
- Grossberg, George T. 2003. "Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Getting on and Staying on." *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* 64 (4): 216–35.
- Halgren, Thomas A, Robert B Murphy, Richard A Friesner, Hege S Beard, Leah L Frye, W Thomas Pollard, and Jay L Banks. 2004. "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening." *J. Med. Chem.* 47 (7): 1750–59.

- Hanwell, Marcus D, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek, and Geoffrey R Hutchison. 2012. "Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform." *J. Cheminform.* 4 (1): 17.
- Head, John D, and Michael C Zerner. 1985. "A Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno Optimization Procedure for Molecular Geometries." *Chem. Phys. Lett.* 122 (3): 264–70.
- Ho, Bosco K, and Ken A Dill. 2006. "Folding Very Short Peptides Using Molecular Dynamics." *PLoS Comput. Biol.* 2 (4): e27.
- Huang, Yadong, and Lennart Mucke. 2012. "Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies." *Cell* 148 (6): 1204–22.
- Humphrey, William, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. 1996. "VMD: Visual Molecular Dynamics." *J. Mol. Graph.* 14 (1): 33–38.
- Huo, Shuanghong, Junmei Wang, Piotr Cieplak, Peter A Kollman, and Irwin D Kuntz. 2002. "Molecular Dynamics and Free Energy Analyses of Cathepsin D-Inhibitor Interactions: Insight into Structure-Based Ligand Design." *J. Med. Chem.* 45 (7): 1412–19.
- Ikonomovic, Milos D, William E Klunk, Eric E Abrahamson, Chester A Mathis, Julie C Price, Nicholas D Tsopelas, Brian J Lopresti, et al. 2008. "Post-Mortem Correlates of in Vivo PiB-PET Amyloid Imaging in a Typical Case of Alzheimer's Disease." *Brain* 131 (Pt 6): 1630–45.
- Inestrosa, Nibaldo C, Alejandra Alvarez, Cristián A Pérez, Ricardo D Moreno, Matias Vicente, Claudia Linker, Olivia I Casanueva, Claudio Soto, and Jorge Garrido. 1996. "Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- $\beta$ -Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme." *Neuron* 16 (4): 881–91.
- Irwin, John J, and Brian K Shoichet. 2005. "ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening." *J. Chem. Inf. Model.* 45 (1): 177–82.

- Irwin, R L, and H J Smith 3rd. 1960. "Cholinesterase Inhibition by Galanthamine and Lycoramine." *Biochem. Pharmacol.* 3: 147–48.
- Izrailev, S, S Stepaniants, M Balsera, Y Oono, and K Schulten. 1997. "Molecular Dynamics Study of Unbinding of the Avidin-Biotin Complex." *Biophys. J.* 72 (4): 1568–81.
- Jann, Michael W. 2000. "Rivastigmine, a New-Generation Cholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease." *Pharmacotherapy* 20 (1): 1–12.
- Johansson, Anna C V, and Erik Lindahl. 2006. "Amino-Acid Solvation Structure in Transmembrane Helices from Molecular Dynamics Simulations." *Biophys. J.* 91 (12): 4450–63.
- Jones, Gareth, Peter Willett, Robert C Glen, Andrew R Leach, and Robin Taylor. 1997. "Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking." *J. Mol. Biol.* 267 (3): 727–48.
- Karplus, Martin, and Joseph N Kushick. 1981. "Method for Estimating the Configurational Entropy of Macromolecules." *Macromolecules* 14 (2). American Chemical Society: 325–32.
- Kirschner, K N, and R J Woods. 2001. "Solvent Interactions Determine Carbohydrate Conformation." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (19): 10541–45.
- Kruse, Andrew C, Jianxin Hu, Albert C Pan, Daniel H Arlow, Daniel M Rosenbaum, Erica Rosemond, Hillary F Green, et al. 2012. "Structure and Dynamics of the M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor." *Nature* 482 (7386): 552–56.
- Kuksin, A Y, I V Morozov, G E Norman, V V Stegailov, and I A Valuev. 2005. "Standards for Molecular Dynamics Modelling and Simulation of Relaxation." *Mol. Simul.* 31 (14–15): 1005–17.
- Lavorato, Stefania Neiva. 2012. "Planejamento Racional Por Modelagem Molecular, Síntese E Caracterização de Glicosídeos Com Atividade Inibitória Potencial Da Acetilcolinesterase." UFMG.

- Levy, R M, A R Srinivasan, W K Olson, and J A McCammon. 1984. "Quasi-Harmonic Method for Studying Very Low Frequency Modes in Proteins." *Biopolymers* 23 (6): 1099–1112.
- Lobo, A, R Lopez-Anton, J Santabárbara, C de-la-Cámara, T Ventura, M A Quintanilla, J F Roy, et al. 2011. "Incidence and Lifetime Risk of Dementia and Alzheimer's Disease in a Southern European Population." *Acta Psychiatr. Scand.* 124 (5): 372–83.
- López, Susana, Jaume Bastida, Francesc Viladomat, and Carles Codina. 2002. "Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Amaryllidaceae Alkaloids and Narcissus Extracts." *Life Sci.* 71 (21): 2521–29.
- Magalhães, Camila Silva de, Diogo Marinho Almeida, Helio José Correa Barbosa, and Laurent Emmanuel Dardenne. 2014. "A Dynamic Niching Genetic Algorithm Strategy for Docking Highly Flexible Ligands." *Inf. Sci.* 289: 206–24.
- Manjunath, Kavyashree, and Kanagaraj Sekar. 2013. "Molecular Dynamics Perspective on the Protein Thermal Stability: A Case Study Using SAICAR Synthetase." *J. Chem. Inf. Model.* 53 (9): 2448–61.
- Marco, Luis, and Maria d C Carreiras. 2012. "Galanthamine, a Natural Product for the Treatment of Alzheimer's Disease." *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 1 (1): 105–11.
- Martínez, José Mario, and Leandro Martínez. 2003. "Packing Optimization for Automated Generation of Complex System's Initial Configurations for Molecular Dynamics and Docking." *J. Comput. Chem.* 24 (7): 819–25.
- Martínez, Leandro, Alessandro S Nascimento, Fabio M Nunes, Kevin Phillips, Ricardo Aparicio, Sandra Martha G Dias, Ana Carolina M Figueira, et al. 2009. "Gaining Ligand Selectivity in Thyroid Hormone Receptors via Entropy." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (49): 20717–22.
- Miller 3rd, Bill R, T Dwight McGee Jr, Jason M Swails, Nadine Homeyer, Holger Gohlke, and Adrian E Roitberg. 2012. "MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State

- Free Energy Calculations." *J. Chem. Theory Comput.* 8 (9): 3314–21.
- Mimica, Ninoslav, and Paola Presecki. 2009. "Side Effects of Approved Antidementives." *Psychiatr. Danub.* 21 (1): 108–13.
- Mohammad, Dana, Parco Chan, Janelle Bradley, Krista Lanctôt, and Nathan Herrmann. 2017. "Acetylcholinesterase Inhibitors for Treating Dementia Symptoms - a Safety Evaluation." *Expert Opin. Drug Saf.*
- Morris, Garrett M, Ruth Huey, William Lindstrom, Michel F Sanner, Richard K Belew, David S Goodsell, and Arthur J Olson. 2009. "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility." *J. Comput. Chem.* 30 (16): 2785–91.
- Myers, Jonathan, Greg Grothaus, Shivaram Narayanan, and Alexey Onufriev. 2006. "A Simple Clustering Algorithm Can Be Accurate Enough for Use in Calculations of pKs in Macromolecules." *Proteins* 63 (4): 928–38.
- Ni, H, C A Sotriffer, and J A McCammon. 2001. "Ordered Water and Ligand Mobility in the HIV-1 Integrase-5CITEP Complex: A Molecular Dynamics Study." *J. Med. Chem.* 44 (19): 3043–47.
- Numata, Jorge, Michael Wan, and Ernst-Walter Knapp. 2007. "CONFORMATIONAL ENTROPY OF BIOMOLECULES: BEYOND THE QUASI-HARMONIC APPROXIMATION." In *Genome Informatics 2007*.
- Ordentlich, A, D Barak, C Kronman, N Ariel, Y Segall, B Velan, and A Shafferman. 1998. "Functional Characteristics of the Oxyanion Hole in Human Acetylcholinesterase." *J. Biol. Chem.* 273 (31): 19509–17.
- Ott, A, M M.B. Breteler, F v. Harskamp, T Stijnen, and A Hofman. 1998. "Incidence and Risk of Dementia: The Rotterdam Study." *Am. J. Epidemiol.* 147 (6): 574–80.
- Padhye, Subhash, Sanjeev Banerjee, Deepak Chavan, Shubhangini Pandye, K Venkateswara Swamy, Shadan Ali, Jing Li, Q Ping Dou, and Fazlul H Sarkar. 2009. "Fluorocurcumins as Cyclooxygenase-2 Inhibitor: Molecular Docking,

- Pharmacokinetics and Tissue Distribution in Mice." *Pharm. Res.* 26 (11): 2438–45.
- Pezzementi, Leo, Kimberly Johnson, Igor Tsigelny, Justin Cotney, Elizabeth Manning, Andrew Barker, and Sarah Merritt. 2003. "Amino Acids Defining the Acyl Pocket of an Invertebrate Cholinesterase." *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 136 (4): 813–32.
- Pezzementi, Leo, Florian Nachon, and Arnaud Chatonnet. 2011. "Evolution of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Vertebrates: An Atypical Butyrylcholinesterase from the Medaka *Oryzias Latipes*." *PLoS One* 6 (2): e17396.
- Phillips, James C, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D Skeel, Laxmikant Kalé, and Klaus Schulten. 2005. "Scalable Molecular Dynamics with NAMD." *J. Comput. Chem.* 26 (16): 1781–1802.
- Price, Daniel J, and Charles L Brooks III. 2004. "A Modified TIP3P Water Potential for Simulation with Ewald Summation." *The Journal of Chemical Physics* 121 (20). AIP: 10096–103.
- Prince, M, A Comas-Herrera, M Knapp, M Guerchet, and M Karagiannidou. 2016. *The World Alzheimer Report 2016, Improving Healthcare for People Living with Dementia: Coverage, Quality and Costs Now and in the Future*. Edited by Alzheimer's Disease International. London: Alzheimer's Disease International (ADI).
- Priya, R, Rajendrarao Sumitha, C George Priya Doss, C Rajasekaran, S Babu, R Seenivasan, and R Siva. 2015. "Molecular Docking and Molecular Dynamics to Identify a Novel Human Immunodeficiency Virus Inhibitor from Alkaloids of *Toddalia Asiatica*." *Pharmacogn. Mag.* 11 (Suppl 3): S414--22.
- Quinn, Daniel M. 1987. "Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States." *Chem. Rev.* 87 (5): 955–79.
- R Development Core Team. 2008. "R: A Language and Environment for Statistical

- Computing." Vienna, Austria. <http://www.r-project.org>.
- Rarey, M, B Kramer, and T Lengauer. 1999. "Docking of Hydrophobic Ligands with Interaction-Based Matching Algorithms." *Bioinformatics* 15 (3): 243–50.
- Richarz, Richarz, Zhang, Yu, Gaudig, and Barbara Schauble. 2012. "Galantamine versus Donepezil in Chinese Patients with Alzheimer's Disease: Results from a Randomized, Double-Blind Study." *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 571.
- Rodrigues Simoes, Maria, Maria Rodrigues Simoes, Flavia Dias Viegas, Marcella Moreira, Matheus Freitas Silva, Mariana Riquiel, Patricia da Rosa, et al. 2014. "Donepezil: An Important Prototype to the Design of New Drug Candidates for Alzheimer's Disease." *Mini-Rev. Med. Chem.* 14 (1): 2–19.
- Salari, Majid. 2013. "An Iterated Local Search for the Budget Constrained Generalized Maximal Covering Location Problem." *Journal of Mathematical Modelling and Algorithms in Operations Research* 13 (3): 301–13.
- Sali, A, and T L Blundell. 1993. "Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints." *J. Mol. Biol.* 234 (3): 779–815.
- Seeber, Michele, Marco Cecchini, Francesco Rao, Giovanni Settanni, and Amedeo Caflisch. 2007. "Wordom: A Program for Efficient Analysis of Molecular Dynamics Simulations." *Bioinformatics* 23 (19): 2625–27.
- Seshadri, Sudha, Alexa Beiser, Margaret Kelly-Hayes, Carlos S Kase, Rhoda Au, William B Kannel, and Philip A Wolf. 2006. "The Lifetime Risk of Stroke: Estimates from the Framingham Study." *Stroke* 37 (2): 345–50.
- Shen, Rong, Wei Han, Giacomo Fiorin, Shahidul M Islam, Klaus Schulten, and Benoît Roux. 2015. "Structural Refinement of Proteins by Restrained Molecular Dynamics Simulations with Non-Interacting Molecular Fragments." *PLoS Comput. Biol.* 11 (10): e1004368.
- Stelzmann, Rainulf A, H Norman Schnitzlein, and F Reed Murtagh. 1995. "An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper, Über Eine Eigenartige Erkankung Der

- Hirnrinde." *Clin. Anat.* 8 (6): 429–31.
- Taylor, N R, and M von Itzstein. 1994. "Molecular Modeling Studies on Ligand Binding to Sialidase from Influenza Virus and the Mechanism of Catalysis." *J. Med. Chem.* 37 (5): 616–24.
- Taylor, P, and Z Radic. 1994. "The Cholinesterases: From Genes to Proteins." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34 (1): 281–320.
- Tohgi, H, T Abe, K Hashiguchi, M Saheki, and S Takahashi. 1994. "Remarkable Reduction in Acetylcholine Concentration in the Cerebrospinal Fluid from Patients with Alzheimer Type Dementia." *Neurosci. Lett.* 177 (1–2): 139–42.
- Trott, Oleg, and Arthur J Olson. 2010. "AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading." *J. Comput. Chem.* 31 (2): 455–61.
- United Nations. 2015. "World Population Ageing, 2015."
- Vettoretti, Gerolamo, Elisabetta Moroni, Sara Sattin, Jiahui Tao, David A Agard, Anna Bernardi, and Giorgio Colombo. 2016. "Molecular Dynamics Simulations Reveal the Mechanisms of Allosteric Activation of Hsp90 by Designed Ligands." *Sci. Rep.* 6: 23830.
- Wallace, Andrew C, Roman A Laskowski, and Janet M Thornton. 1995. "LIGPLOT: A Program to Generate Schematic Diagrams of Protein-Ligand Interactions." *Protein Engineering, Design and Selection* 8 (2): 127–34. doi:10.1093/protein/8.2.127.
- Wang, Junmei, Wei Wang, Peter A Kollman, and David A Case. 2006. "Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations." *J. Mol. Graph. Model.* 25 (2): 247–60.
- Wang, Junmei, Romain M Wolf, James W Caldwell, Peter A Kollman, and David A Case. 2004. "Development and Testing of a General Amber Force Field." *J. Comput. Chem.* 25 (9): 1157–74.



- 
- Wang, Renxiao, Luhua Lai, and Shaomeng Wang. 2002. "Further Development and Validation of Empirical Scoring Functions for Structure-Based Binding Affinity Prediction." *J. Comput. Aided Mol. Des.* 16 (1): 11–26.
- Wickham, Hadley. 2009. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <http://ggplot2.org>.
- Wilcock, G K, S Lilienfeld, and E Gaens. 2000. "Efficacy and Safety of Galantamine in Patients with Mild to Moderate Alzheimer's Disease: Multicentre Randomised Controlled Trial. Galantamine International Study Group." *BMJ* 321 (7274): 1445–49.
- Woolf, Thomas B, and Benoît Roux. 1996. "Structure, Energetics, and Dynamics of Lipid–protein Interactions: A Molecular Dynamics Study of the Gramicidin A Channel in a DMPC Bilayer." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 24 (1). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 92–114.  
doi:10.1002/(SICI)1097-0134(199601)24:1<92::AID-PROT7>3.0.CO;2-Q.
- Zhang, Yingkai, Jeremy Kua, and J Andrew McCammon. 2002. "Role of the Catalytic Triad and Oxyanion Hole in Acetylcholinesterase Catalysis: An Ab Initio QM/MM Study." *J. Am. Chem. Soc.* 124 (35): 10572–77.

## 6 Apêndice

O presente trabalho de mestrado resultou em um artigo científico que, durante o processo de homologação da atual dissertação, encontra-se submetido e em processo de avaliação em revista indexada.